# ANWENDUNG DER KERNRESONANZ- UND MASSENSPEKTROSKOPIE AUF PROBLEME DER NATURSTOFFCHEMIE

vorgelegt von

Wilhelm Kuhnz

aus

Oberkammlach

1979

# ANWENDUNG DER KERNRESONANZ- UND MASSENSPEKTROSKOPIE AUF PROBLEME DER NATURSTOFFCHEMIE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität, München

vorgelegt von
Wilhelm Kuhnz
aus
Oberkammlach
1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547009_0007

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Rembold durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Jakob Rascher meinen herzlichen Dank für zahlreiche wertvolle Diskussionen und Ratschläge aussprechen.

Herrn Prof. Dr. H. Rembold, der den Fortgang dieser Arbeit entscheidend beeinflußt hat, sei für sein Interesse gedankt.

Schließlich möchte ich Fräulein G. Schild für die Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren und Fräulein Lydia Steiner für die Reinschrift der vorliegenden Arbeit danken.

INHALTSVERZEICHNIS


| | Seite |
|---|---|
| EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG | 1-8 |
| MATERIAL UND METHODEN | 9-14 |
| ERGEBNISSE UND DISKUSSION | 15-66 |
| 1. Anwendung der $^{13}$C-NMR-Spektroskopie auf Juvenilhormon III und analoge Verbindungen | 15-21 |
| 2. Anwendung von Verschiebungsreagenzien in der $^{1}$H-NMR-Spektroskopie von Juvenilhormonen | 22-26 |
| 3. Untersuchungen zur $^{1}$H-Kernresonanzspektroskopie von Europium-(III)-Flavonol-Chelaten | 27-37 |
| 4. Qualitative und quantitative Analyse der O-(β-hydroxyethyl)-Rutoside | 38-59 |
| 5. Versuche zur quantitativen Bestimmung O-β-hydroxyethylierter Rutoside in Humanserum | 60-66 |
| ZUSAMMENFASSUNG | 67-68 |
| LITERATUR | 69-71 |
| LEBENSLAUF | 72 |

# EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war, spezielle Techniken der Kernresonanzspektroskopie und Massenspektrometrie auf naturstoffchemische Probleme anzuwenden, die in unserem Arbeitskreis bearbeitet werden.

Die Isolierung und Charakterisierung von Naturstoffen aus biologischem Material bedarf einer hochentwickelten Analytik. Diese umfaßt neben den zahlreichen chromatographischen Verfahren, die eine Trennung und Reinigung der Stoffgemische ermöglichen, insbesondere die verschiedenen spektroskopischen Methoden, die zur Strukturanalyse der isolierten Verbindungen häufig herangezogen werden. Die spektroskopische Analyse hat nicht nur den Vorteil der "zerstörungsfreien" Meßung, sondern benötigt auch meist nur geringe Substanzmengen, ein bei Naturstoffproblemen besonders wichtiger Punkt. Die wichtigsten und am häufigsten verwendeten Verfahren der Spektroskopie, nämlich UV-, IR-, NMR- und Massenspektrometrie, sind in der Lage, ganz spezifische, jeweils durch ihre methodischen Besonderheiten bedingte Aussagen über vorliegende Strukturelemente zu machen. In der Regel ergänzen sich diese Aussagen; eine vollständige Strukturbestimmung erfordert deshalb üblicherweise die Kombination mehrerer Methoden.

Während beispielsweise die UV-Spektroskopie sich im wesentlichen auf die Aussagen über möglicherweise im Molekül vorhandene Chromophore und deren Veränderung in Abhängigkeit von wechselnder Substitution beschränkt, können durch die

Interpretation eines IR-Spektrums bereits Angaben über die Anwesenheit der verschiedensten funktionellen Gruppen gemacht werden. Wesentlich detailliertere Angaben über die Molekülstruktur ermöglicht die Anwendung der NMR-Spektroskopie. Insbesondere durch eine Kombination von $^{1}H$- und $^{13}C$-NMR-Spektroskopie können die untersuchten Verbindungen oft vollständig in Konfiguration und Konformation beschrieben werden. Die dazu nötige Substanzmenge konnte durch die Einführung der Puls-Fourier-Transform-Technik drastisch gesenkt werden[1]. In jüngster Zeit wird zur Lösung von Strukturproblemen oder zum Nachweis geringster Substanzmengen in breitem Ausmaß die Massenspektrometrie eingesetzt. Die charakteristischen Fragmentierungen der untersuchten Moleküle erlauben die Bestimmung des Molekulargewichtes ebenso wie Aussagen über die Struktur. Bei Verwendung einer GC-MS-Kopplung können auch aus komplexen Gemischen die charakteristischen Daten einzelner Verbindungen bestimmt werden. Dies ist ein entscheidender Vorteil gegenüber allen anderen Methoden, die hohe Anforderungen an die Reinheit der Substanzen stellen. Der Substanzbedarf für die Aufnahme eines Massenspektrums liegt unter 1 µg.

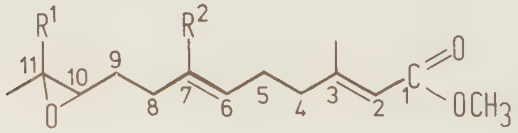
Im Zusammenhang mit Arbeiten, die sich mit der Kastenbildung bei der Honigbiene beschäftigen, wurden umfangreiche Untersuchungen über die hormonelle Regulation der Entwicklung durchgeführt. Eines der Schlüsselhormone, das Juvenilhormon, ist in der vorliegenden Arbeit Gegenstand von kernresonanzspektroskopischen Untersuchungen. Mit Hilfe der $^{13}C$-NMR-

Spektroskopie wird gezeigt, daß auch sehr ähnliche Verbindungen, die durch chemische Modifikation aus Juvenilhormonen hervorgehen, unterschieden werden können. Am Beispiel der Juvenilhormone I und III wird gezeigt, daß durch die Verwendung sogenannter Verschiebungsreagenzien die relativ komplexen $^{1}$H-NMR-Spektren der Hormone stark vereinfacht werden, was eine Zuordnung der einzelnen Resonanzsignale erleichtert.

Ein weiterer Interessenschwerpunkt unserer Arbeitsgruppe liegt in der Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Pflanze und Insekt. Insbesondere die Suche nach pflanzlichen Inhaltsstoffen mit fraßhemmender oder metamorphosestörender Wirkung ist dabei von Bedeutung. Die bisher in der Literatur beschriebenen Verbindungen umfassen eine ganze Reihe von Verbindungsklassen, u.a. auch Flavonoide.
Eine kernresonanzspektroskopische Untersuchung sollte klären, ob bei den Flavonolen mit ihrem ausgeprägten Chelatisierungsvermögen eine analytische Anwendung von Salzen der seltenen Erden möglich ist. Schließlich sollte versucht werden, die bei den Flavonolen seit längerem mit Erfolg eingesetzte Methode der Massenspektrometrie in ihrer Anwendungsbreite und Empfindlichkeit zu erweitern. Es wird gezeigt, daß mit Hilfe der Massenspektrometrie ein komplexes Gemisch substituierter Flavonole [O-(β-hydroxyethyl)-Rutoside] qualitativ und quantitativ analysiert werden kann. Ferner soll gezeigt werden, daß durch die Anwendung von SIM (selected ion monitoring) die Nachweisgrenze für die einzelnen Komponenten des Flavonolgemisches erheblich gesenkt wird. Schließlich werden Ver-

suche zur Aufarbeitung und zum Nachweis des Rutosidgemisches aus Humanserum beschrieben. Im folgenden soll zu beiden Themenkreisen, den biologischen Funktionen des Juvenilhormons einerseits und der Flavonoide andererseits ein kurzer und notwendigerweise unvollständiger Überblick über einige der wichtigsten Tatsachen gegeben werden.

Die Entwicklung der Insekten vom Ei über die Larvenstadien zur Puppe und schließlich zum adulten Individuum wird durch drei Hormongruppen gesteuert[2]. Die neurosekretorischen Zellen des Gehirns produzieren u.a. ein prothoracotropes Hormon, das durch Stimulierung der Prothoraxdrüsen die Ausschüttung des Häutungshormons Ecdyson reguliert. Häutungen sind für das normale Wachstum des Insekts unerläßlich. Dafür wird noch eine weitere Hormongruppe, die der Juvenilhormone benötigt.




I: $R^1 = R^2 = C_2H_5$ (JH-I)

II: $R^1 = C_2H_5$, $R^2 = CH_3$ (JH-II)

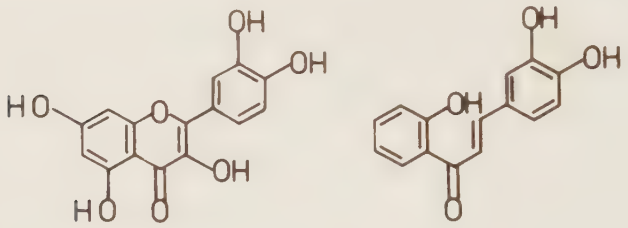
III: $R^1 = R^2 = CH_3$ (JH-III)

Abb. 1: Strukturformeln der drei natürlich vorkommenden Juvenilhormone I, II und III

Diese von den Corpora allata produzierten Hormone verhindern die vom Ecdyson induzierte Häutung zur Puppe bzw. zum fertigen Insekt und halten den larvalen Zustand aufrecht[2]. Nach der letzten Larvenhäutung sinkt der JH-Titer und zugleich wird ein starkes Ansteigen des Ecdysonspiegels beobachtet, durch den nun die Entwicklung zur Puppe induziert wird. Das Juvenilhormon wurde zuerst von Röller et al.[3] aus Insekten isoliert. Synthetisch wurde JH-I erstmals von Röller et al.[4] dargestellt. Seither beschäftigen sich eine Vielzahl von Arbeiten mit der unterschiedlichen biochemischen Bedeutung der drei Juvenilhormone ebenso wie mit der Synthese einer kaum noch überschaubaren Zahl von analogen Verbindungen. Eines der Ziele all dieser Arbeiten ist nicht zuletzt die Absicht, geeignete Analoga des Juvenilhormons zur Schädlingsbekämpfung einzusetzen. Die Möglichkeit, ein Schadinsekt durch Eingriff in seine hormonell gesteuerte Entwicklung zu schädigen und unschädlich zu machen, ist zweifellos verlockend, wenn auch eine praktische Anwendung der Juvenoide bisher nur selten gelang.

Die Flavonoide gehören zu den im Pflanzenreich am weitesten verbreiteten Verbindungen. Sie liegen entweder als freie Aglykone oder aber an Zucker gebunden in Form von Glykosiden vor. In zahlreichen bisher erschienenen Veröffentlichungen wurden chemische und strukturanalytische Aspekte dargestellt oder es wurde versucht, Klarheit über die biologische und biochemische Bedeutung der Flavonoide zu erhalten[5]. Unter dem

Begriff "Flavonoide" werden Substanzen wie Flavonole, Flavone, Aurone und Chalcone zusammengefaßt.




XI

Abb. 2: Beispiele für Flavonoide. Quercetin (Flavonol) links (XI), 2'3,4-Trihydroxychalcon rechts.

Alle Flavonoide zeichnen sich durch spezifische Absorptionen im sichtbaren oder im ultravioletten Wellenlängenbereich aus. So absorbieren Flavone und Flavonole im Bereich von 250 - 350 nm, die Anthocyanine zwischen 520 und 560 nm. In diesem Bereich zeigen die übrigen pflanzlichen Photorezeptoren wie das Chlorophyll, die Carotinoide und das Phytochrom eine minimale Absorption. Aus diesem Verhalten wird deutlich, daß die Flavonoide die Funktion von Pflanzenpigmenten erfüllen könnten. Die Attraktion von Insekten und Vögeln durch Blütenfarbstoffe läßt sich also zu einem großen Teil auf die Anwesenheit von Flavonoiden zurückführen. Erst vor wenigen Jahren fand man die sogenannten Phytoalexine[6]. Das sind antimikrobielle Metabolite, die in gesunden Pflanzen entweder gar nicht oder nur in geringen Mengen vorhanden sind. Zellen, die durch

Bakterien oder Pilze infiziert wurden, bilden sie in vermehrtem Umfang.

Phytoalexine haben bakteriostatische und fungizide Eigenschaften und erinnern an eine Art von Immunantwort der Pflanze. Eine ganze Reihe von ihnen sind Flavonoide.

Szent Györgyi fand 1936, daß einige Flavonolglykoside bei subkutanem Kapillarbluten eine heilende Wirkung zeigten[7]. Diese Flavonoide, als deren wirksamstes später das Rutin erkannt wurde, erhielten zunächst die Bezeichnung Vitamin P. Der Vitamincharakter konnte jedoch nicht bestätigt werden, u.a. weil die Substanzen für den Säuger nicht essentiell sind und auch keine Avitaminosen bekannt sind. Der Einfluß von Flavonolglykosiden auf die Membranpermeabilität führte zur therapeutischen Anwendung dieser Verbindungen bei venösen Erkrankungen.

Eine weitere Eigenschaft der Flavonoide ist ihre Wirksamkeit als Antioxidantien. Ascorbinsäure, die sich vor allem in Zellen mit hoher metabolischer Aktivität wie z.B. den Mitochondrien befindet, dient dort als Reduktionsmittel[8]. Die zelluläre Oxidation von Ascorbat findet in Gegenwart von Sauerstoff statt und wird durch Metalle katalysiert. Mehrere Flavonoide dienen als Antioxidantien für Ascorbinsäure; ihre Wirkung beruht offensichtlich auf ihrem Chelatisierungsvermögen für Metallkationen. Die Chelatisierung kann entweder über eine 3',4'-Diol-Gruppierung oder über eine 3-Hydroxy-4-Carbonyl- bzw. 5-Hydroxy-4-Carbonylfunktion erfolgen.

Aufgrund dieser Befunde wurde von van Fleet[9] vorgeschlagen, daß eine Hauptfunktion der Flavonoide im pflanzlichen Gewebe die von Antioxidantien sei.

# MATERIAL UND METHODEN

## 1. Material

Die Juvenilhormone I und III waren gaschromatographisch rein (> 99 %). Das Verschiebungsreagenz (1,1,1,2,2,3,3-Heptafluoro-7,7-perdeuterodimethyl-4,6-octandionato)-Eu(III) (Merck) wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

Die JH-Analogen wurden nach bekannten Vorschriften synthetisiert[14,41,42] und mit Hilfe von $^{1}$H-NMR- und Massenspektroskopie charakterisiert. Der Reinheitsgrad wurde mittels Gaschromatographie kontrolliert (> 98 %).

Die verwendeten Flavonole (Roth) wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt, ebenso das $Eu(ClO_4)_3 \cdot 6D_2O$ (Merck).

Das Harz Amberlite XAD-2 wurde von der Firma Serva bezogen.

Das verwendete Humanserum wurde durch Zentrifugation von Mischblut gewonnen. Das Gemisch hydroxyethylierter Rutoside (HER), reines 7-Mono-O-β-hydroxyethylrutosid und $^{14}$C-markiertes HER waren ein Geschenk der Firma Zyma (München).

## 2. Methoden

### 2.1 Kernresonanzspektroskopie

#### 2.1.1 $^{1}$H-NMR-Spektroskopie der Juvenilhormone

Die $^{1}$H-NMR-Messungen wurden mit der Puls-Fourier-Transformationsmethode bei 90 MHz an einem WH-90 Gerät der Firma Bruker durchgeführt. Bei einer Pulsdauer von 0.5 µs wurden pro Probe 50 Scans akkumuliert. Zur Messung wurden je 5 mg

Juvenilhormon in 0.3 ml $CDCl_3$ gelöst, als innerer Standard wurde TMS verwendet.

2.1.2 $^{13}$C-NMR-Spektroskopie von Juvenilhormon und analogen Verbindungen

Die Substanzen wurden als 20 - 40 % Lösung in Benzol-$d_6$ mit TMS als innerem Standard vermessen. Alle Messungen wurden mit einem WH-90 Gerät (Bruker) bei 22.63 MHz durchgeführt. Von jeder Substanz wurde ein Breitband-entkoppeltes- und ein off-resonance-Spektrum aufgenommen.

2.1.3 $^{1}$H-NMR-Spektroskopie von Flavonol-Eu(III)-Chelaten

Die Flavonole wurden in Aceton-$d_6$ gelöst, als innerer Standard diente in allen Fällen TMS. Die Messungen wurden mit einem WH-90 (Bruker) oder einem HA-100 (Varian) durchgeführt. Die Lösungen wurden wie folgt bereitet:

a) Messung mit dem WH-90 Gerät

   1 mg des Flavonols wurde in 0,3 ml Aceton-$d_6$ gelöst und mit 1 mg des Verschiebungsreagenzes versetzt.

b) Messung mit dem HA-100 Gerät

   10 mg des Flavonols wurden in 0,4 ml Aceton-$d_6$ gelöst. Das Verschiebungsreagenz wurde in 2 mg-Anteilen zugesetzt. Nach jeder Zugabe wurde die Substanz vermessen, bis schließlich 10 mg des Verschiebungsreagenzes zugegeben waren.

## 2.2 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Messungen wurden mit einem CH-7A-DF-Gerät (MAT) mit SS-100 MAT Rechnersystem durchgeführt. Die Spektren wurden bei einer Elektronenenergie von 70 eV und einer Emission von 1 mA aufgenommen. Die Ionenquellentemperatur lag bei 250 °C. Bei den SIM-Messungen wurde der Probentiegel im Hochvakuum in 200 sec von 175 °C auf 250 °C aufgeheizt. Als innerer Standard zur Kalibrierung des Massenspektrometers wurde das Fragment m/e 683 des Tris(perfluoroheptyl)-5-Triazins verwendet.

## 2.3 UV-Spektroskopie

Die UV-Spektren einzelner β-Hydroxyethyl-Rutoside wurden in methanolischer Lösung mit einem Unicam SP 800 (Leitz) aufgenommen.

## 2.4 Gaschromatographie

Die gaschromatographischen Messungen wurden mit einem Fractovap Gerät (Carlo Erba) durchgeführt, das mit einer 25 m langen Glaskapillarsäule SE-30 (LKB) und Flammenionisationsdetektor ausgerüstet war. Die Substanzen wurden entweder über einen Splitter (1/30) oder splitless injiziert. Während der Trennung wurde ein Temperaturprogramm mit einer Heizrate von 10 °C/Min eingestellt. Die Starttemperatur lag je nach Substanz zwischen 100 °C und 240 °C, die Endtemperatur bei 300 °C -320 °C. Als Trägergas wurde Helium verwendet; die durch die

Kapillarsäule fließende Gasmenge lag bei 8 ml/Min; Temperatur von FID und Einspritzblock 250 °C.

## 2.5 Gelchromatographie

20 mg der O-β-hydroxyethylierten Aglykone wurden in 10 ml Methanol gelöst. Die Lösung wurde auf eine mit Methanol äquilibrierte Sephadex LH-20-Säule (80 x 2,5 cm) aufgetragen und mit Methanol eluiert. Das Eluat wurde durch eine UV-Meßzelle (LKB, 258 nm) geleitet und in einem Fraktionsteiler aufgefangen. Einzelne Fraktionen wurden in gleicher Weise rechromatographiert. Die Reinheit der Substanzen war 95 - 98 %, wie durch die gaschromatographische Kontrolle gezeigt werden konnte. Die Chromatographie der Rutoside wurde in gleicher Weise durchgeführt.

## 2.6 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgelfertigplatten (Merck) mit einer Schichtdicke von 0,25 - 0,5 mm verwendet. Die Kieselgelschichten enthielten einen Fluoreszenzindikator $F_{254}$, die chromatographierten Substanzen wurden unter dem UV-Licht sichtbar gemacht.

## 2.7 Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

Für die Reinigung der permethylierten Flavonole über HPLC wurde ein modifiziertes Gerät der Firma Siemens verwendet. Zur Chromatographie wurde eine 25 cm Kieselgel-Fertigsäule (Merck) mit $CHCl_3/CH_3OH$ (98/2) als Laufmittel benutzt.

## 2.8 Hydrolyse der 0-3-hydroxyethylierten Rutoside

50 mg des Rutosidgemisches (HER) wurden in 5 ml 1N-HCl gelöst und in einer abgeschmolzenen Ampulle 10 Minuten lang bei 200 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Hydrolysat auf eine Amberlite XAD-2 Säule (10 x 1 cm) aufgetragen. Die freien Zucker wurden mit Wasser eluiert (40 ml). Das Aglykongemisch wurde mit Methanol eluiert (50 ml) und das Lösungsmittel unter Wasserstrahlvakuum abgezogen. Der orangerote Rückstand wurde im Exsikkator getrocknet.

## 2.9 Trimethylsilylierung der Rutoside bzw. der freien Aglykone

Zwischen 500 ng und 0,5 mg der Rutoside bzw. der Aglykone wurden in 10 µl Pyridin gelöst und mit 40 µl einer Mischung aus N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) und Trimethylchlorsilan (TMCS) im Verhältnis 80 : 20 versetzt. Man erhitzte im verschlossenen Reaktionsgefäß 15 Minuten lang bei 150 °C.

## 2.10 Permethylierung bzw. Perdeuteromethylierung der Aglykone nach Hakomori[10]

1 - 5 mg des Aglykons oder der Aglykonmischung wurde in 50 - 150 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Dazu wurden 1 - 3 ml einer Lösung von $DMSO^{\ominus}$, die durch Reaktion von DMSO und NaH hergestellt wurde, zugefügt. Man rührte im verschlossenen Gefäß 15 Minuten lang bei 50 °C. Nach dem Abkühlen der Lösung

gab man unter Kühlung vorsichtig 2 - 5 ml $CH_3J$ bzw. $CD_3J$ zu und rührte bei Raumtemperatur 1 Stunde lang. Schließlich verteilte man die Reaktionsmischung zwischen $H_2O$ und $CHCl_3$ und wusch die organische Phase mehrmals mit Wasser. Man trocknete die organische Phase über Natriumsulfat, entfernte das Lösungsmittel und chromatographierte den Rückstand über eine Kieselgel-Dünnschichtplatte ($CHCl_3/CH_3OH$, 98/2).

Die Substanz wurde mit $CHCl_3$ von der Kieselgelschicht eluiert, vom Lösungsmittel befreit und konnte nun im Direkteinlaßsystem massenspektroskopisch vermessen werden.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

## 1. Anwendung der $^{13}$C-NMR-Spektroskopie auf Juvenilhormon III und analoge Verbindungen

Neben den natürlich vorkommenden Juvenilhormonen I, II und III gibt es einige Verbindungen, die entweder potentielle biogenetische Vorläufer der Juvenilhormone sind[11], wie z.B. der Farnesensäuremethylester (VIII), oder als Metabolite im Insekt aufgefunden wurden, wie der 10,11-Dihydroxyfarnesensäuremethylester (IX)[12]. Schließlich wurde zur chemischen Charakterisierung von Juvenilhormonen, die aus Insekten isoliert wurden, von einigen Arbeitsgruppen der 10-Hydroxy-11-methoxy-farnesensäuremethylester hergestellt (X)[13,14].
Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit der Frage, ob diese Verbindungen mit Hilfe der $^{13}$C-NMR-Spektroskopie in ihrer Struktur klar voneinander unterschieden werden können.
Zu diesem Zweck wurden die Verbindungen III bis X untersucht (siehe Abb. 3). Bei den Verbindungen IV-VII handelt es sich um kurzkettige Homologe der Verbindungen III, VIII, IX und X. Durch den Vergleich der $^{13}$C-NMR-Spektren homologer Paare konnte gezeigt werden, daß die Substituenteneffekte funktioneller Gruppen in beiden Homologen gleich groß und damit von der Kettenlänge des Moleküls unabhängig waren.

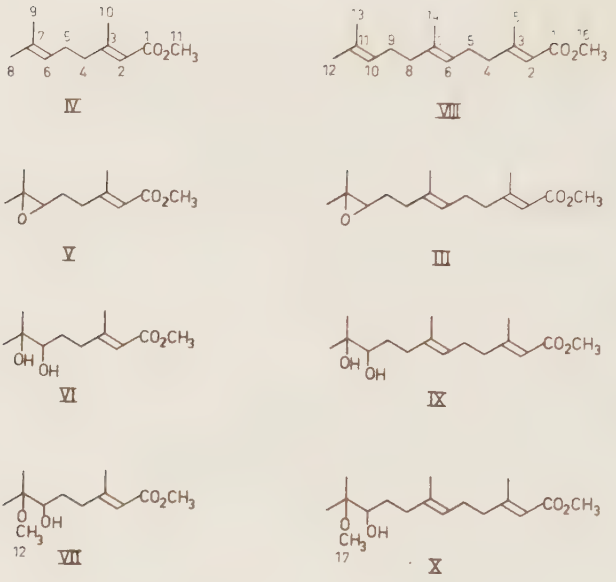



Abb. 3: Strukturformeln der untersuchten Verbindungen

Die Zuordnung der einzelnen Signale erfolgte durchweg durch "off-resonance"-Messungen. In Fällen, bei denen keine eindeutige Zuordnung möglich war, wurden entweder die bekannten Werte von Referenzsubstanzen aus der Literatur herangezogen oder eine Entscheidung dadurch getroffen, daß experimentell gefundene Werte mit den nach Grant[15] berechneten Werten verglichen wurden.

In Tabelle 1 sind alle vermessenen Substanzen mit den zugeordneten Signalen aufgeführt.

| VERBINDUNG | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | C-7 | C-8 | C-9 | C-10 | C-11 | C-12 | C-13 | C-14 | C-15 | C-16 | C-17 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| IV | 166.8 | 115.9 | 159.6 | 41.1 | 26.5 | 123.7 | 132.3 | 25.7 | 17.6 | 18.7 | 50.4 | — | — | — | — | — | - |
| V | 166.9 | 115.8 | 158.8 | 37.7 | 27.1 | 63.4 | 58.2 | 24.8 | 24.8 | 18.7 | 50.7 | — | — | — | — | — | — |
| VII | 167.0 | 115.9 | 160.4 | 38.3 | 29.5 | 76.4 | 77.5 | 20.3* | 20.3* | 19.2* | 50.4 | 48.8 | — | — | — | — | — |
| VI | 167.4 | 115.9 | 160.5 | 38.3 | 29.8 | 77.9 | 73.2 | 23.9* | 26.5* | 19.0 | 50.8 | — | — | — | - | - | - |
| VIII | 166.7 | 116.0 | 159.5 | 41.2 | 26.3 | 123.6 | 136.1 | 40.2 | 27.2 | 124.9 | 131.2 | 25.8 | 17.8 | 16.1 | 18.7 | 50.4 | — |
| III | 167.2 | 115.7 | 159.9 | 41.0 | 26.1 | 123.8 | 135.5 | 36.5 | 27.7 | 64.2 | 58.2 | 25.0 | 25.0 | 16.2 | 18.9 | 50.9 | — |
| X | 167.0 | 115.3 | 160.0 | 40.9 | 25.9 | 123.2 | 136.0 | 36.7 | 29.6 | 76.2 | 77.4 | 20.3 | 20.3 | 18.6 | 19.0 | 50.8 | 48.9 |
| IX | 167.3 | 115.7 | 160.0 | 40.9 | 26.0 | 123.7 | 136.0 | 36.8 | 29.9 | 78.0 | 73.1 | 23.9* | 26.9* | 15.9 | 18.8 | 50.8 | — |

Tab. 1: Zugeordnete Einzelresonanzen der Verbindungen (III) - (X). Zur Numerierung siehe Abb. 3. Alle Werte sind in ppm, bezogen auf den internen Standard TMS, angegeben. Lösungsmittel Hexadeuterobenzol. Bei den mit * gekennzeichneten Signalen ist u.U. die getroffene Zuordnung zu vertauschen.

Die Signale der Verbindung (IV) konnten anhand der Literatur[16] mit Ausnahme von C-9 und C-10 zugeordnet werden. Durch einen Vergleich der Resonanzen von Verbindung (V) bis (VII) konnten die Signale von C-9 und C-10 identifiziert werden. Von den beiden Signalen sollte sich nur das Signal von C-9 wesentlich in seiner Lage ändern, da es sich in unmittelbarer Nähe des mit wechselnden Substituenten versehenen C-Atoms 7 befindet. C-10 hingegen ist fünf Bindungen von C-7 entfernt

und damit nicht mehr einem von dort ausgehenden Substituenteneinfluß unterworfen. Verbindung (V) wurde durch off-resonance-Messungen eindeutig identifiziert. Die chemischen Verschiebungen der C-Atome 6 und 7, die Teil des Epoxidringes sind, wurden zusätzlich nach der Methode von Paulson[17] berechnet, wobei die Abweichung vom experimentell gefundenen Wert nur 1.1 ppm betrug. Die beiden C-Atome 8 und 9 liefern nur ein Signal. Bei Verbindung (VII) erfolgte die Zuordnung der Signale wiederum teils durch off-resonance-Messung, teils durch Berechnung der Resonanzfrequenzen. Im Falle der C-Atome 8 und 9 (die ein gemeinsames Signal liefern) und 10 war keine sichere Unterscheidung möglich. Die Differenz der beiden Signale beträgt nur 1.5 ppm, eine Differenz, die in der Fehlergrenze der Berechnung liegt. Die von uns getroffene Entscheidung scheint deshalb sinnvoll, weil in diesem Fall die Resonanz von C-10 die geringste Änderung erfährt, was durch die große Entfernung vom Ort der Substitution plausibel erscheint. Bei Verbindung (VI) konnten lediglich die Resonanzsignale bei $\delta$ = 23,9 und $\delta$ = 26,5 ppm nicht eindeutig identifiziert werden. Wir ordneten diese Signale den C-Atomen 8 und 9 zu, die bei (V) und (VII) ein gemeinsames Signal lieferten. Die Ursache der magnetischen Inäquivalenz der C-Atome 8 und 9 könnte die Ausbildung von intra- oder intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen sein, die durch die Anwesenheit der 1,2-Diol-Gruppierung begünstigt wird. Dadurch wäre die freie Drehbarkeit der C-6-C-7-Bindung aufgehoben, wodurch für C-8 und C-9 eine unterschiedliche räumliche Umgebung resultiert.

Die Zuordnung der Signale zu den beiden C-Atomen konnte nicht eindeutig bestimmt werden.

Bei Verbindung (VIII) erfolgte die Identifizierung der Resonanzsignale durch Vergleich mit der Literatur[18], wobei einige Signale, deren Zuordnung dort offen blieb, anhand der Änderung bei unterschiedlicher Substitution erklärt werden konnten. Die zunächst schwierige Unterscheidung zwischen C-5 und C-9 wurde durch den Vergleich mit den an C-10 und C-11 substituierten Verbindungen möglich, die eine deutliche Verschiebung an C-9 aufweisen, C-5 jedoch unberührt lassen. Ebenso konnte unter Berücksichtigung der substituierten Verbindungen zwischen C-2, C-6 und C-10 unterschieden werden. Die Zuordnung der Signale von (III) erfolgte ohne Schwierigkeiten durch Vergleich mit (V) einerseits und Literaturangaben[19] andererseits. Die Berechnung der den Epoxid-Sauerstoff tragenden C-Atome 10 und 11 ergab eine Abweichung von 1,9 bzw. 1,1 ppm vom experimentell ermittelten Wert. Verbindungen (IX) und (X) wurden in gleicher Weise identifiziert wie ihre Analoga (VI) und (VII), sowohl durch Vergleich mit den vorhergehenden Verbindungen als auch durch Berechnung und off-resonance-Messung. Bei (IX) wiederholt sich das Problem der beiden geminalen Methylgruppen C-12 und C-13, die wiederum zwei separate Signale liefern; die vorgeschlagenen $\delta$-Werte sind daher u.U. zu vertauschen. Wie aus Abb. 4 und 5 deutlich wird, waren die inkrementellen Änderungen der chemischen Verschiebungen der einzelnen C-Atome, verursacht durch wechselnde Substitution an C-6 und C-7 bzw. C-10 und C-11 bei

beiden Substanzreihen gleich groß. Insbesondere konnte gezeigt werden, daß an Zentren unterschiedlicher Substitution eine drastische Änderung der chemischen Verschiebung auftritt, was zur analytischen Unterscheidung der einzelnen Verbindungen herangezogen werden kann.

Die oben diskutierten Beispiele zeigen, daß die $^{13}$C-NMR-Spektroskopie ein ausgezeichnetes Hilfsmittel in der Analytik der Terpene darstellt und wegen der empfindlichen Änderung der chemischen Verschiebung in Abhängigkeit von der Substitution eine gute Differenzierung zwischen nahe verwandten Verbindungen ermöglicht. Durch die Puls-Fourier-Transformation lassen sich Substanzmengen im Milligrammbereich vermessen. Das war bei den untersuchten Juvenilhormonen besonders günstig. Zusammen mit der $^{1}$H-NMR-Spektroskopie und der möglichen Verwendung von Shift-Reagenzien ist eine bisher bei weitem noch nicht ausgeschöpfte NMR-Analytik dieser Naturstoffe möglich.

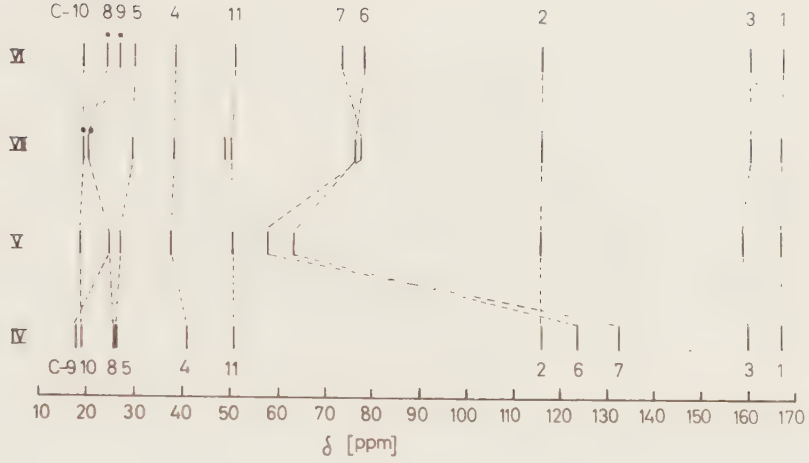



Abb. 4: Korrelationsdiagramm der C-Resonanzen von Verbindung IV bis VII. Die ppm-Werte sind auf TMS als internem Standard bezogen. Die Zuordnung der mit * bezeichneten Signale ist u.U. zu vertauschen.

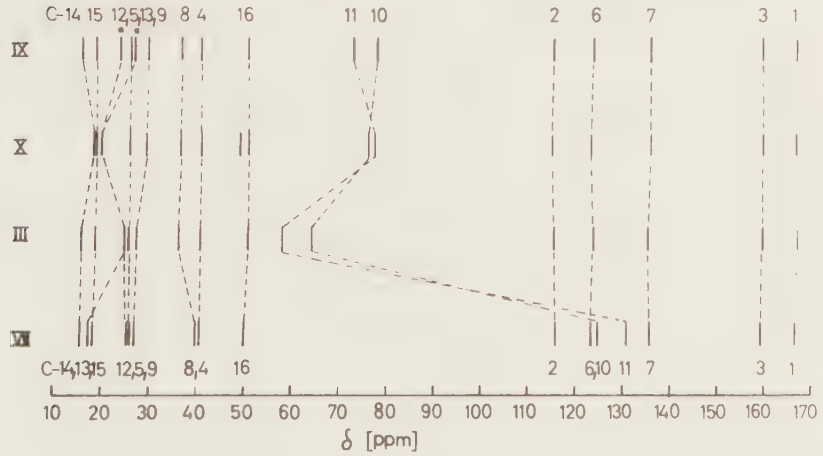



Abb. 5: Korrelationsdiagramm der C-Resonanzen von Verbindung III, VIII, IX und X. Die ppm-Werte sind auf TMS als internem Standard bezogen. Die Zuordnung der mit * bezeichneten Signale ist u.U. zu vertauschen.

## 2. Anwendung von Verschiebungsreagenzien in der $^{1}$H-NMR-Spektroskopie von Juvenilhormonen

Im Jahre 1969 zeigte Hinckley[20], daß die Signale des Cholesterins im Protonenresonanzspektrum eine paramagnetische Verschiebung erfuhren, wenn er das Dipyridinaddukt von Tris-(dipivalomethanato)-europium(III), ein Komplex mit 6 ungepaarten 4f-Elektronen, der Cholesterinlösung zusetzte. Seither fanden die Lanthanidenkomplexe eine zunehmend breitere Anwendung in der Protonen- und $^{13}$C-Kernresonanzspektroskopie[21,22]. Eine der wesentlichsten Eigenschaften dieser Komplexe ist ihre Fähigkeit, komplizierte NMR-Spektren dadurch zu vereinfachen, daß einzelne Resonanzlinien, die zuvor eine gemeinsame überlagerte Signalgruppe bildeten, selektiv verschoben werden. Im Idealfall erhält man Spektren erster Ordnung.
In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß mit Hilfe des Europiumkomplexes Eu(FOD)$_3$-d$_{27}$ eine wesentliche Vereinfachung im Protonenresonanzspektrum der Juvenilhormone I (JH-I) und III (JH-III) möglich ist. Die Juvenilhormone sind für eine Anwendung der Verschiebungsreagenzien besonders geeignet, da zwei koordinationsfähige funktionelle Gruppen im Molekül vorhanden sind. Sowohl die Methylester- als auch die Epoxy-Gruppe kommen als Komplexierungspartner in Betracht. Unter der Annahme, daß beide Funktionen in ihrer Basizität vergleichbar sind[23,24], ist eine Auffächerung der Resonanzlinien von beiden Enden des Moleküls aus zu erwarten.
Die Wahl der Verschiebungsreagenzien wurde angesichts der Forderung nach maximaler Verschiebungskraft bei minimaler

Signalverbreiterung einerseits sowie guter Löslichkeit und fehlender Eigenabsorption andererseits getroffen.

Abb. 6 zeigt das H-NMR-Spektrum von Juvenilhormon I (JH-I). Die Signalgruppe bei $\delta$ = 2,2 enthält die Protonen von H-4, H-5, H-8, H-16 und H-17. Bei $\delta$ = 1,0 bilden die Resonanzlinien der Methylgruppen H-13 und H-15 eine unaufgelöste Signalgruppe. Ähnlich sind die Verhältnisse beim Juvenilhormon III (JH-III, siehe Abb. 7), wo bei $\delta$ = 2,18 die Resonanzlinien von H-8, H-9 und H-15 bzw. bei $\delta$ = 1,65 die Protonen H-4, H-5 und H-14 vereinigt sind.
Durch inkrementelle Zugabe von $Eu(FOD)_3$-$d_{27}$ zu der in $CDCl_3$ gelösten Probe konnte in beiden Fällen eine deutliche Auffächerung der kumulierten Signale erreicht werden. In den Abbildungen 6 und 7 sind über den Spektren ohne Zusatz von Verschiebungsreagenz diejenigen Spektren abgebildet, bei denen das Verhältnis Verschiebungsreagenz/Substrat ein Optimum an Signaldiskriminierung ergab. Die Zuordnung der Signale wurde durch Doppelresonanz bestätigt. Trotz der Verschiebung einzelner Signale bis zu 9 ppm ist keine wesentliche Signalverbreiterung festzustellen. Dies schließt eine wesentliche Beteiligung der Kontakt-Wechselwirkung an der Verschiebung aus[22]. Den Gesamtverlauf der relativen chemischen Verschiebungen in Abhängigkeit von der Zugabe an Verschiebungsreagenz geben Abbildung 8 und 9 wieder.

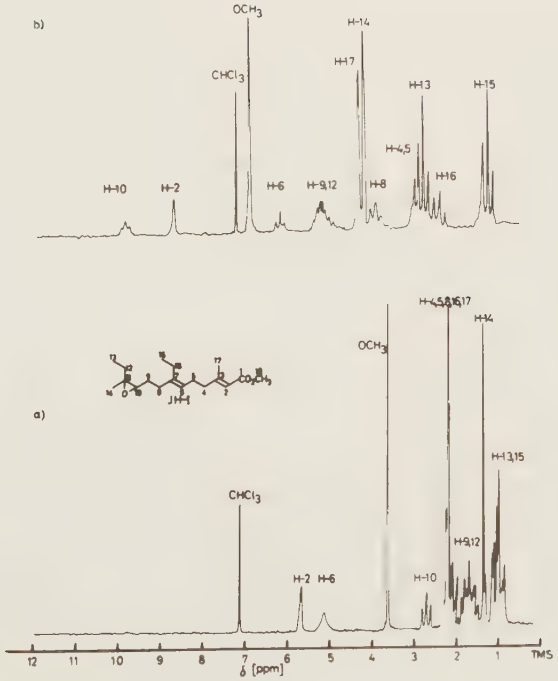



Abb. 6: $^{1}$H-NMR-Spektrum von Juvenilhormon I mit TMS als internem Standard
a) ohne Zusatz von Verschiebungsreagenz (V.R.)
b) (V.R.)/(JH-I) = 0,8

Abb. 7: $^{1}$H-NMR-Spektrum von Juvenilhormon III mit TMS als internem Standard
a) ohne Zusatz von Verschiebungsreagenz
b) (V.R.)/(JH-III) = 1,0

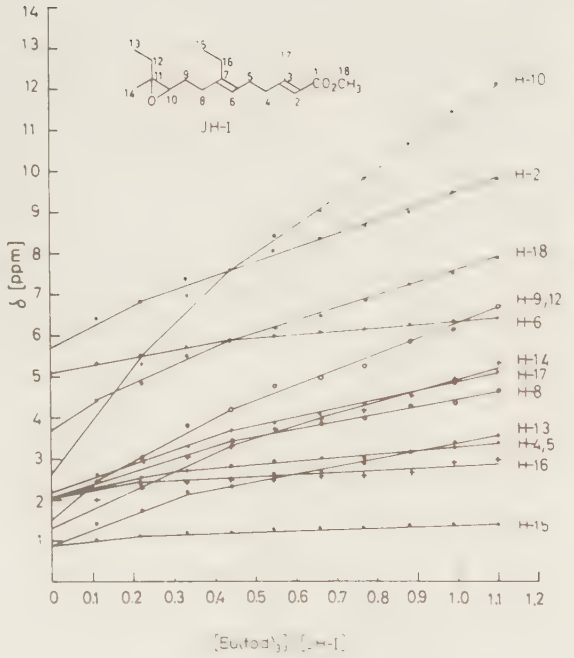



Abb. 8: Änderung der chemischen Verschiebung für die einzelnen Protonen in JH-I mit steigender Konzentration von $Eu(FOD)_3$-$d_{27}$.

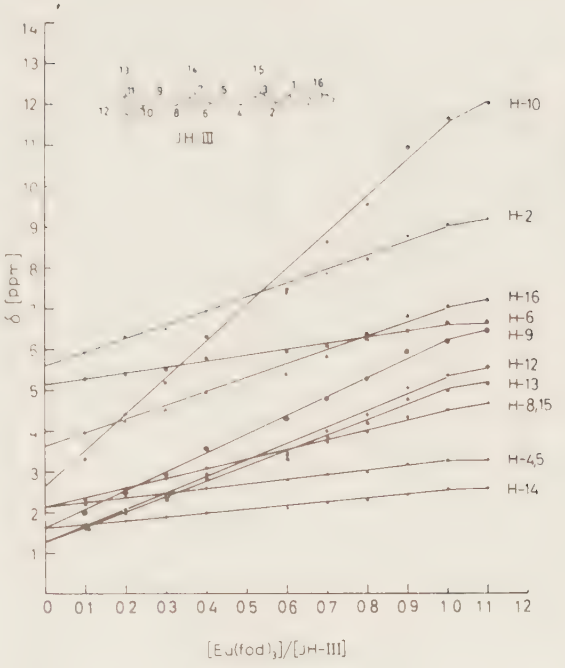



Abb. 9: Änderung der chemischen Verschiebung für die einzelnen Protonen in JH-III mit steigender Konzentration von $Eu(FOD)_3$-$d_{27}$

Man sieht, daß eine völlige Separierung aller Signale nicht gelang. Dies rührt zum Teil daher, daß einzelne Protonen relativ weit von beiden Koordinationszentren entfernt liegen und so keine wesentliche Verschiebungsdifferenz erfahren können, wie z.B. H-4 und H-5. Bei JH-I zeigt eine Betrachtung am Molekülmodell, daß die Methylenprotonen H-9 und H-12 den selben Abstand und wahrscheinlich die gleiche Winkelfixierung relativ zum Epoxid-Sauerstoff haben, der hier als Komplexierungszentrum in Erscheinung tritt, und folglich auch identische Verschiebungen erfahren. Aus den Steigungen der Kurven wird deutlich, daß von Anfang an beide Zentren komplexiert werden. Dies läßt darauf schließen, daß die Komplexbildungskonstanten in beiden Fällen von vergleichbarer Größe sind und somit auch die Basizität von Epoxy- und Methylestergruppe. Schließlich ist den Abbildungen 8 und 9 zu entnehmen, daß diejenigen Protonen, die sich in der Mitte des Moleküls befinden, nur eine relativ geringe Verschiebung erfahren. Dies steht in Einklang mit der bekannten Tatsache, daß der Einfluß des paramagnetischen Zentrums mit wachsender Entfernung abnimmt[22].

Die dargelegten Versuche zeigen, daß die Verwendung von Verschiebungsreagenzien eine brauchbare und einfache Methode zur Vereinfachung der $^{1}$H-NMR-Spektren der Juvenilhormone darstellt.

## 3. Untersuchungen zur $^1$H-Kernresonanzspektroskopie von Europium(III)-Flavonol-Chelaten

Seit einer Reihe von Jahren ist bekannt, daß Flavonole mit $Al^{3+}$-Ionen stabile Chelate bilden. Davon wird in der UV-Spektroskopie Gebrauch gemacht, da die UV-Spektren der Flavonolchelate signifikante bathochrome Verschiebungen ihrer Absorptionsbanden zeigen.

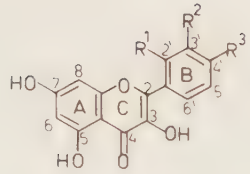
Aus der Größe der bathochromen Verschiebung lassen sich analytisch wertvolle Aussagen über die Anzahl und Stellung der vorhandenen phenolischen Hydroxylgruppen machen. Außerdem sind qualitative Aussagen über die Komplexierungstendenz unterschiedlich substituierter Flavonole möglich[25]. Darüber wurden von mehreren Arbeitsgruppen Untersuchungen durchgeführt[26,27,28,29]. Die Resultate zeigten, daß die Komplexierungstendenz der einzelnen Flavonoltypen in folgender Reihenfolge abnimmt:

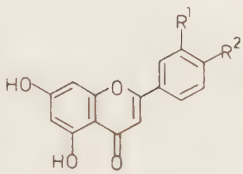
3-Hydroxy-flavon > 5-Hydroxy-flavon > 5-Hydroxy-flavanon > 0-Dihydroxy-flavon > 3-Hydroxy-flavanon

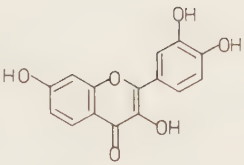
Die bereits vorhandenen ausführlichen Untersuchungen aus dem Bereich der UV-Spektroskopie veranlaßten uns, nach Möglichkeiten der analytischen Anwendung von Flavonolchelaten in der Protonenkernresonanzspektroskopie zu suchen. Dabei bietet sich die Kombination zweier Phänomene an, einerseits das Komplexierungsvermögen der Flavonole mit Metallkationen, andererseits die paramagnetischen Eigenschaften der Lanthaniden.

Die Verwendung von Chelaten der Lanthaniden, insbesondere des Europiums als sogenannte Verschiebungsreagenzien ist mittlerweile eine häufig angewandte und bewährte Methode in der Kernresonanzspektroskopie geworden[30]. Die in der Kernresonanzspektroskopie üblichen β-Diketonate können jedoch aus Gründen der Löslichkeit und konkurrierender Solvatation mit dem Lösungsmittel nur in unpolaren Medien wie $CCl_4$, $CHCl_3$ oder $C_6H_6$ mit Erfolg eingesetzt werden. In eben diesen Lösungsmitteln ist jedoch die Mehrzahl der Flavonole sehr schwer löslich. Aus einigen wenigen Arbeiten ist dagegen bekannt, daß die Nitrate bzw. Perchlorate des $Eu^{3+}$-Ions auch in polaren Lösungsmitteln wie Aceton, Methanol oder Wasser noch paramagnetische Verschiebungen der Resonanzlagen bewirken und zudem ausreichende Löslichkeit aufweisen[31,32]. Unter Berücksichtigung dieser bekannten Tatsachen untersuchten wir eine Reihe von unterschiedlich substituierten Flavonolen unter Verwendung von $Eu(ClO_4)_3 \cdot 6\ D_2O$ als Verschiebungsreagenz. Als Lösungsmittel erwies sich Aceton-$d_6$ als besonders geeignet, da einerseits alle untersuchten Flavonole ausreichend löslich waren und andererseits eine optimale Verschiebung bei minimaler Signalverbreiterung erfolgte. In polareren Lösungsmitteln, wie DMSO oder Pyridin, war die erzielte Verschiebung nur gering und die Signalverbreiterung erheblich.

Die Verwendung von wasserfreiem $Eu(ClO_4)_3$ brachte keine Vorteile, sondern erschwerte wegen des stark hygroskopischen Verhaltens der Substanz ihre exakte Zugabe zu den gelösten Substanzen.



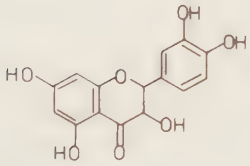


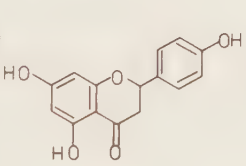


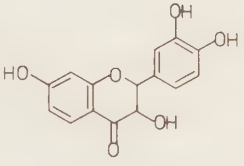
XI $R^2=R^3=OH$ $R^1=H$
XII $R^1=R^2=H$ $R^3=OH$
XIII $R^1=R^3=OH$ $R^2=H$

XIV $R^1=R^2=OH$
XV $R^1=H$ $R^2=OH$

XVI







XVII XVIII XIX

Abb. 10: Strukturformeln der untersuchten Flavonole XI-XIX

| VERBINDUNG | H-2 Δδ | H-3c Δδ | H-3t Δδ | H-3 Δδ | H-5 Δδ | H-6 Δδ | H-8 Δδ | H-2' Δδ | H-3'_ Δδ | H-5' Δδ | H-6' Δδ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| XI Quercetin | — | — | — | — | — | +0.12 | +0.23 | +0.67 | — | +0.17 | +0.61 |
| XII Kampferol | — | — | — | — | — | +0.15 | +0.26 | +0.76 | +0.20 | +0.20 | +0.76 |
| XIII Morin | — | — | — | — | — | +0.90 | +0.27 | — | +0.30 | +0.51 | +1.24 |
| XIV Luteolin | — | — | — | +0.30 | — | +0.14 | +0.41 | +0.09 | — | +0.02 | +0.11 |
| XV Apigenin | — | — | — | +0.26 | — | +0.02 | +0.27 | +0.07 | +0.01 | +0.01 | +0.07 |
| XVI Fisetin | — | — | — | — | +1.04 | +0.77 | +0.69 | +1.12 | — | +0.77 | +1.13 |
| XVII Dihydroquercetin | -0.01 | — | +0.22 | — | — | +0.11 | +0.11 | -0.03 | — | -0.05 | -0.05 |
| XVIII Naringenin | +0.13 | +0.02 | -0.02 | — | — | +0.14 | +0.14 | +0.04 | ±0.00 | ±0.00 | +0.04 |
| XIX Dihydrofisetin | -0.30 | — | +0.80 | — | +0.95 | +0.22 | +0.30 | -0.12 | — | -0.16 | -0.39 |

Tab. 2: Relative induzierte chemische Verschiebungen der Verbindungen XI-XIX. Das Molverhältnis von Shiftreagenz/ Flavonol beträgt 0,5. Alle Werte sind auf TMS als internem Standard bezogen.

Zwischen der Entfernung ($r_i$) der einzelnen Protonen vom Komplexierungszentrum und der induzierten chemischen Verschiebung ($\Delta_i$) der zugehörigen Resonanzsignale besteht ein Zusammenhang, den die Mc Connell-Robertson Gleichung beschreibt[33]:

$$\Delta_i = K \frac{3 \cos^2 \Theta - 1}{r_i^3}$$

Dieser Gleichung, die noch einen Geometriefaktor ($\Theta_i$) berücksichtigt, liegt die Auffassung zugrunde, daß die induzierte chemische Verschiebung durch dipolare Wechselwirkungen zwischen Substrat und Komplexbildner verursacht wird. Diese vereinfachte Betrachtungsweise ist für die Protonen H-2' und H-6' des B-Rings unzureichend. Neben der rein dipolaren Wechselwirkung trägt offensichtlich die Kontaktwechselwirkung, die auf eine mögliche Spin-Delokalisierung innerhalb des Addukts Flavonol-$Eu^{3+}$-Ion zurückzuführen ist, zur beobachteten Verschiebung der Protonen H-2' und H-6' bei. Durch das bei den Flavonolen XI-XVI vorliegende konjugierte System von Ring C und B wirkt sich dieser Term deutlich auf die Resonanzlagen der Protonen von Ring B aus, wenn man von H-5' absieht, das in seiner Lage unverändert bleibt. Beim Übergang von der ungesättigten Verbindung (XVI) zur korrespondierenden hydrierten Verbindung (XIX) oder entsprechend beim Übergang von (XI) zu (XVII), vermindern sich die chemischen Verschiebungen der Protonen H-2' und H-6' viel stärker als die zweifellos veränderte Geometrie erwarten

lassen würde. Daher können diese Werte nicht für quantitative Überlegungen herangezogen werden.

Bei den Protonen des Rings A liegen die Verhältnisse etwas anders. Hier besteht keine unmittelbare Konjugation mit der Doppelbindung in Ring C, so daß eine Beeinflussung der Resonanzlagen der A-Ring-Protonen durch eine Kontaktwechselwirkung über diese Doppelbindung vernachlässigbar sein sollte. Dennoch werden die Resonanzlagen von H-6 und H-8 von dem Vorhandensein der C-C-Doppelbindung in Ring C beeinflußt und können nur bedingt für eine quantitative Betrachtung verwendet werden. Als relatives Maß für die Stärke des vorliegenden Komplexes wird daher die Größe der induzierten chemischen Verschiebung des Protons H-5' in Abhängigkeit zur Entfernung vom Komplexzentrum herangezogen. Wie auch aus anderen Arbeiten[34] hervorgeht, die sich mit der $^{13}$C-Kernresonanz von Flavonolen beschäftigten, wird H-5' von einem Wechsel der Oxidationsstufe in Ring C nicht beeinflußt. Dennoch können die auf dieser Basis erhaltenen Werte nur relativer Natur sein, da über die exakte Lage des Lanthanidions im Komplex keine Kenntnis besteht. Zudem kann, anders als bei den üblicherweise verwendeten Lanthanid-diketonaten bei den Lanthanidsalzen nicht vorausgesetzt werden, daß nur ein konformativ einheitliches Addukt aus Substrat und Verschiebungsreagenz gebildet wird. Alle diese Faktoren erlauben nur eine vergleichende qualitative Interpretation der experimentellen Daten. Die stärkste induzierte Verschiebung des Protons H-5' liegt beim Fisetin (XVI) vor, das somit den stabilsten Komplex mit

$Eu^{3+}$-Ionen bildet. Deutlich geringer sind die induzierten Verschiebungen bei den Quercetin (XI)- und Kämpferol (XII)-Komplexen sowie beim Dihydrofisetin (XIX). Die Komplexierungstendenz von Dihydroquercetin (XVII), Luteolin (XIV) und Apigenin (XV) ist offensichtlich sehr viel geringer ausgeprägt als bei den bisher betrachteten Flavonolen. Die induzierte chemische Verschiebung des Protons H-5' beträgt zum Teil nur noch 1/10 der zuvor erhaltenen Werte. Das Naringenin (XVIII) schließlich bildet den schwächsten Komplex, da keine Änderung der chemischen Verschiebung an H-5' zu verzeichnen ist.
Danach ergibt sich folgende Reihe mit abnehmender Komplexierungstendenz:

3-Hydroxy-flavon $\rangle$ 3,5-Dihydroxy-flavon $\rangle$ 3-Hydroxy-2,3-dihydro-flavon $\rangle$ 5-Hydroxy-flavon $\gg$ 3,5-Dihydroxy-2,3-dihydroflavon $\rangle$ 5-Hydroxy-2,3-dihydroflavon

Eine kritische Betrachtung der Richtung der induzierten chemischen Verschiebung führt zu folgenden Schlußfolgerungen:

- Bei den 2,3-ungesättigten Flavonolen XI-XVI erfahren alle Protonen eine diamagnetische Verschiebung nach höherem Feld.
- Bei den 2,3-Dihydroflavonolen XVII und XIX werden die Protonen des Ringes A nach höherem, die Protonen des Ringes B nach tieferem Feld verschoben. Die zueinander trans-ständigen Protonen H-2 und H-3 werden nach tiefem bzw. hohem

Feld verschoben. Offensichtlich gewinnt hier durch die veränderte Komplexkonfiguration der Geometriefaktor in der Mc Connell-Robertson-Gleichung an Bedeutung.

- Im Falle des Naringenins (XVIII) scheint eine von den beiden zuerst diskutierten Fällen verschiedene Konformation des Gesamtkomplexes vorzuliegen. Hier werden sowohl die Protonen von Ring A und B, als auch H-2 und das cisständige Proton H-3 nach hohem Feld verschoben, nur H-3t erfährt eine paramagnetische Verschiebung.

Wie bereits in anderen Arbeiten[31,32] festgestellt wurde, sind die geometrischen Relationen zwischen Substrat und Lanthanidionen ungleich schwerer zu erfassen als bei den entsprechenden Lanthanid-diketonaten. Die Assoziation des Verschiebungsreagenzes an das Substrat wird immer unter dem Gesichtspunkt der minimalen sterischen Wechselwirkung erfolgen. Größere Variationen des Geometriefaktors weisen auf größere Unterschiede in den vorliegenden Komplexkonfigurationen hin. Diese können z.B. durch wechselnde Koordination eine $Eu^{3+}$-Ions mit einem oder mehreren Substratmolekülen aufgezwungen werden. Eine sukzessive Zugabe von Europiumsalz zu den gelösten Flavonolen ergab zwar in den meisten Fällen eine lineare Abhängigkeit der induzierten chemischen Verschiebung, was auf nur einen Komplex mit fester Koordinationszahl des Metallions hinweist, doch traten z.B. beim Morin (XIII) im Vergleich zu XI und (XII) zum Teil stark abweichende Beträge der chemischen Verschiebungen korrespondierender Protonen auf.

Die Verwendung von Salzen der seltenen Erden als Verschiebungsreagenzien mit dem Ziel der Vereinfachung von Spektren höherer Ordnung sei hier noch kurz diskutiert.

In Abb. 11 sind die Spektren von Morin (XIII) und Dihydrofisetin (XIX) dargestellt. Man erkennt deutlich, daß durch Zugabe von geringen Mengen Shift-Reagenz zu den gelösten Substanzen eine deutliche Spreizung und Vereinfachung der Spektren erreicht wurde. Selbst bei relativ kleinen Molverhältnissen von Shift-Reagenz/Substrat können Verschiebungen von mehr als einem ppm erzielt werden. Die auftretende Linienverbreiterung ist relativ gering und kann mit der bei der Verwendung von Lanthanidchelaten zu erwartenden Verbreiterung verglichen werden. Lediglich Fernkopplungen von 1-2 Hz können eventuell nicht mehr registriert werden.
Dennoch steht einer breiten Anwendung dieser Technik auf dem Gebiet der Flavonole deren schlechte Löslichkeit, insbesondere die der Glykoside entgegen, die z.B. in Aceton nicht mehr vermessen werden können. In polaren Lösungsmitteln wie DMSO ist eine Verwendung der Verschiebungsreagenzien nicht mehr möglich, da hier aufgrund der starken Wechselwirkungen dieser Verbindungen mit dem Lösungsmittel starke Signalverbreiterungen auftreten.

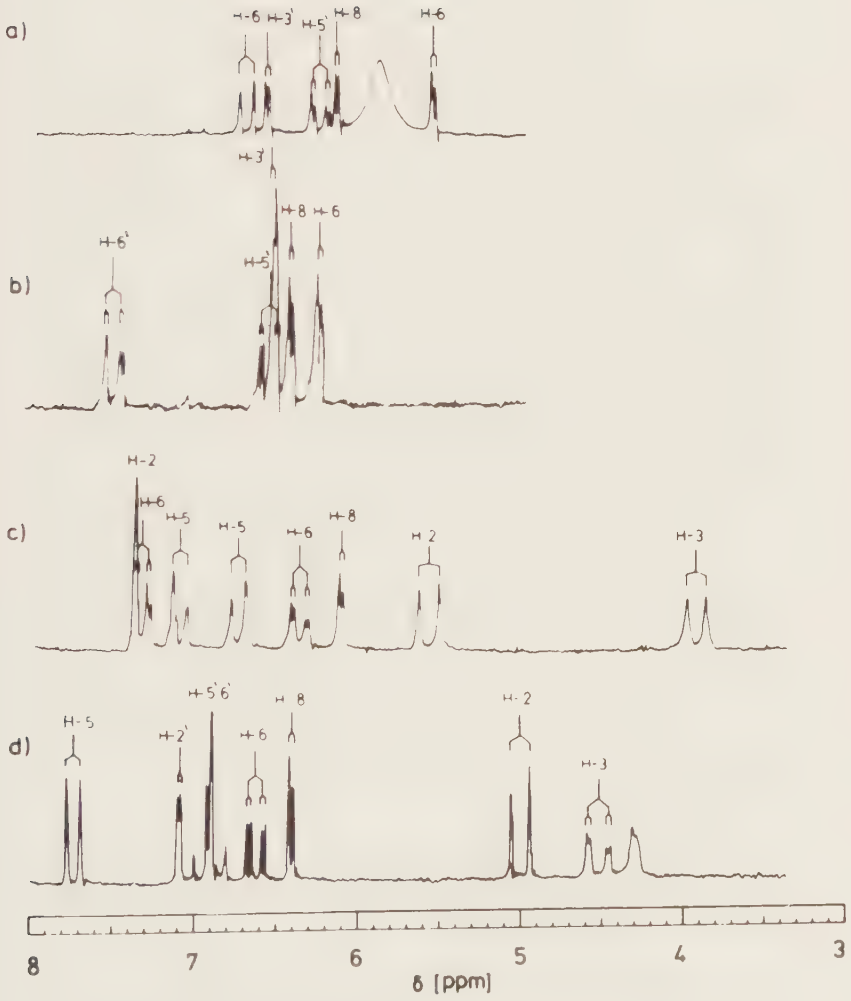



Abb. 11: $^{1}$H-NMR-Spektren von Morin (XIII) und Dihydrofisetin (XIX). a) 10 mg Morin + 10 mg $Eu(ClO_4)_3 \cdot 6\ D_2O$. b) Morin c) 10 mg Dihydrofisetin + 8 mg $Eu(ClO_4)_3 \cdot 6\ D_2O$. d) Dihydrofisetin. Alle Proben wurden in 0,4 ml Aceton-$d_6$ mit TMS als internem Standard vermessen.

Anhand der dargelegten Befunde wurde eine Reihe von Flavonolen mit abnehmender Komplexbildungstendenz aufgestellt. Diese Reihe steht nicht in Einklang mit derjenigen, die sich aus den Ergebnissen der UV-Spektroskopie ableitet. Zwar bestehen einige Unterschiede zu der vorliegenden Arbeit insofern, als zwei verschiedene Metallkationen verwendet wurden ($Eu^{3+}$ besitzt einen nahezu doppelt so großen Ionenradius wie $Al^{3+}$)[35] und die UV-Messungen in Methanol bzw. im vorliegenden Fall in Aceton vorgenommen wurden, was sicherlich eine unterschiedliche Stabilisierung der diskutierten Komplexe bedingt, doch scheint der Widerspruch zwischen den Aussagen der beiden Methoden andere wesentliche Ursachen zu haben.
Bei der kernresonanzspektroskopischen Untersuchung der Komplexierungstendenz einzelner Flavonole werden nur die Protonen H-5' von Ring B miteinander verglichen. Dabei können Konjugationseffekte weitgehend ausgeschlossen werden. Kritisch bleibt lediglich die Variation des Geometriefaktors beim Übergang zu den hydrierten Verbindungen (XVII, XVIII, XIX). Der Geometriefaktor allein kann jedoch kaum für die drastische erzielte Verschiebung einzelner Protonen verantwortlich gemacht werden.
Bei vergleichender Analyse der UV-Daten wird bei den ungesättigten Flavonolen die Lageveränderung von Bande I vermessen.
Bei den hydrierten Flavonolen wird die Veränderung von Bande II gemessen. Als Folge der fehlenden Konjugation zwischen Ring B und Ring C wirkt sich bei diesen Verbindungen eine

unterschiedliche Substitution nur sehr wenig auf die Lage von Bande I aus. Die wechselseitige Beeinflussung der beiden Ringe ist jedoch nicht genau gleich groß und deshalb kann z.B. das Paar Fisetin (XVI)/Dihydrofisetin (XIX) nicht in dieser Weise verglichen werden. Bei der Interpretation der UV-Daten wird ein Konjugationseffekt als Maß für die Komplexierungstendenz genommen, was nicht ohne weiteres gerechtfertigt erscheint[26-29]. Bei der Analyse der NMR-Daten wird das Resonanzsignal eines Protons betrachtet, dessen Lage unabhängig davon ist, ob Ring C ungesättigt oder hydriert ist. Die deutliche Verschiebung von H-5' zeigt im Falle des Dihydrofisetins (XIX), daß dieses Flavonol ein starker Komplexbildner ist. Ohne den analytischen Wert der routinemäßigen Strukturermittlung von Flavonolsubstitutionsmustern über die UV-spektrometrische Vermessung von Flavonolchelaten bezweifeln zu wollen, müssen dennoch Bedenken an der mit dieser Methode aufgestellten Reihe von abnehmender Komplexierungstendenz einzelner Flavonole geltend gemacht werden.

4. Qualitative und quantitative Analyse der O-(β-hydroxyethyl)-Rutoside

Bei der Umsetzung von Rutin mit Ethylenoxid oder Ethylenchlorhydrin werden die phenolischen Hydroxylgruppen β-hydroxyethyliert. Dabei entsteht ein komplexes Gemisch von mono-, di-, tri- und tetrasubstituierten Rutosiden. Theoretisch sind insgesamt 15 Syntheseprodukte möglich und zwar: 4 Monoether, 6 Diether, 4 Triether und 1 Tetraether.

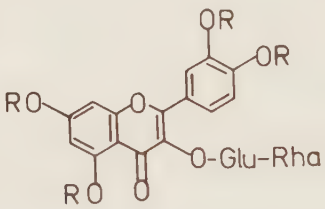



Abb. 12: Strukturformeln der O-(β-hydroxyethyl)-Rutoside
R = $CH_2CH_2OH$ oder H

Da sich die Reaktivität der einzelnen phenolischen Hydroxylgruppen aber zum Teil stark unterscheidet, ist nicht mit allen grundsätzlich denkbaren Produkten zu rechnen. Im folgenden soll untersucht werden, welche Reaktionsprodukte tatsächlich vorliegen und wie groß ihr jeweiliger mengenmäßiger Anteil ist. Beide Fragen sind mit Hilfe der Massenspektrometrie in Kombination mit der Gaschromatographie zu lösen. Um das massenspektroskopische Verhalten der Rutoside zu untersuchen, wurden durch Gelchromatographie an Sephadex LH-20

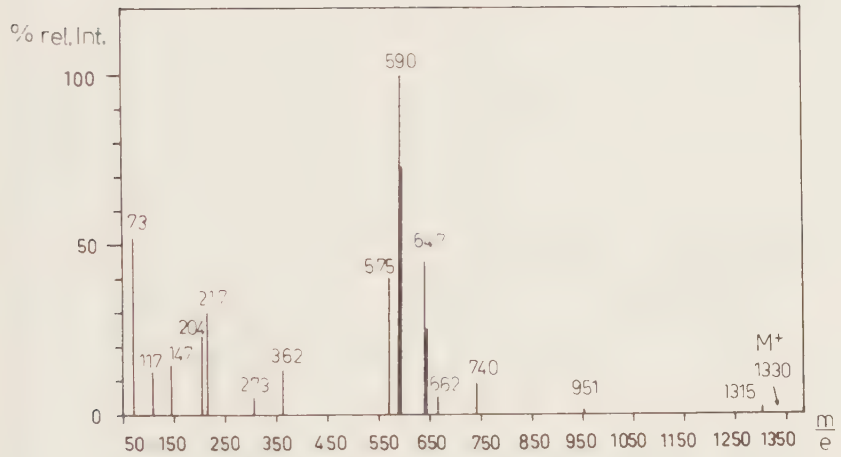



Abb. 12: Massenspektrum von Rutin (TMS-Derivat)

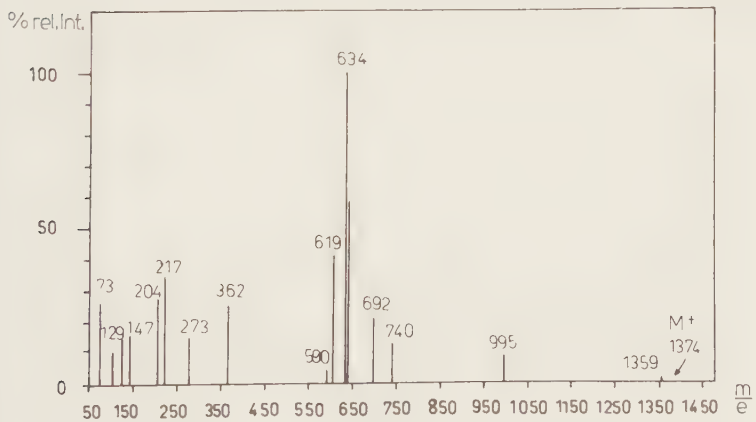



Abb. 13: Massenspektrum von 7-Mono-β-hydroxyethyl-rutosid (TMS-Derivat).

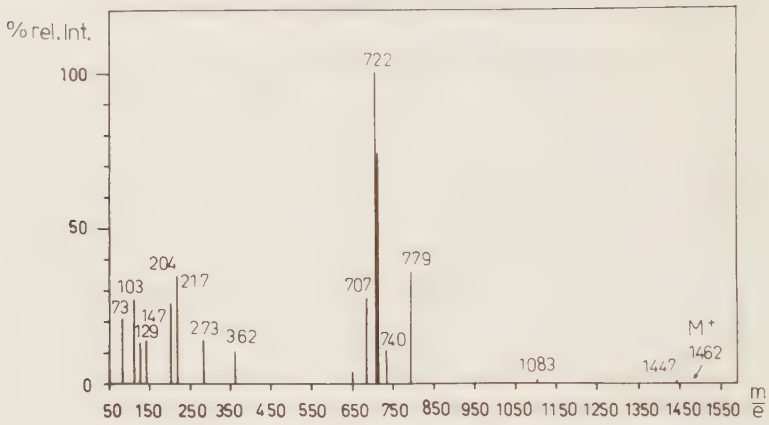



Abb. 14: Massenspektrum von 7,3',4'-Tri-β-hydroxyethyl-rutosid (TMS-Derivat).

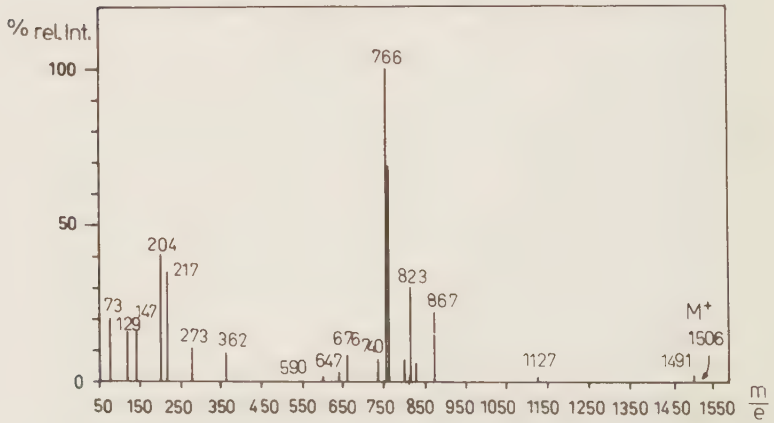
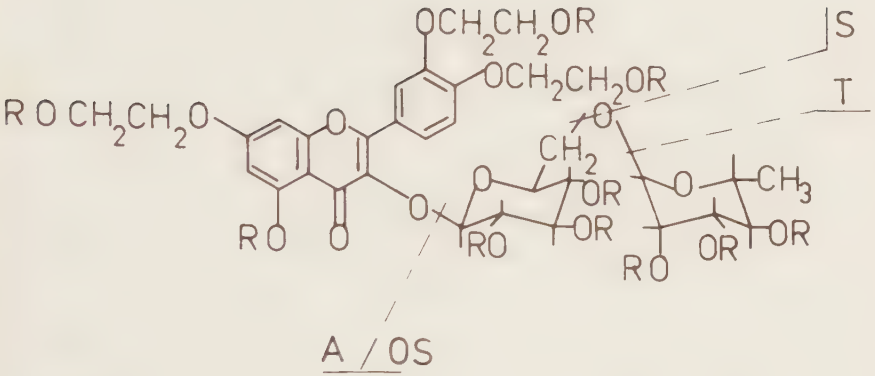



Abb. 15: Massenspektrum von 5,7,3',4'-Tetra-β-hydroxyethyl-rutosid (TMS-Derivat).




| VERBINDUNG | A+H | S | OS-H | T-H |
|---|---|---|---|---|
| XX | 590 | 951 | 740 | 362 |
| XXI | 634 | 995 | 740 | 362 |
| XXII | 722 | 1083 | 740 | 362 |
| XXIII | 766 | 1127 | 740 | 362 |

Abb. 16 + 16a: Fragmentierungsschema der trimethylsilylierten Rutoside (R = TMS) XX = Rutin, XXI = 7-Mono-Ether, XXII = 7,3',4'-Tri-Ether, XXIII = 5,7,3',4'-Tetra-Ether.

mit Methanol zwei der Hauptkomponenten des Rutosidgemisches isoliert. Nach Rechromatographie wurden diese, sowie reines 7-Mono-Rutosid und Rutin selbst, trimethylsilyliert und über das Direkteinlaßsystem im Massenspektrometer vermessen. Die Massenspektren sind in Abb. 12 - 15, das zugehörige Fragmentierungsschema in Abb. 16 + 16a dargestellt.
Nach Scheels und Zinsmeister[36] können anhand der Spektren der trimethylsilylierten Glykoside folgende Aussagen gemacht werden:

- Das intensivste Signal des Spektrums entsteht durch Abspaltung des Aglykons unter gleichzeitiger Protonenwanderung (A+H). Dieses Signal erlaubt bereits eine Aussage über den Substitutionsgrad des Aglykons, da im Vergleich zum Rutin für jede vorhandene β-Hydroxyethyl-Seitenkette die Masse des Aglykons um 44 Masseneinheiten steigt. Weitere Fragmentierungen des Aglykons durch Retro-Diels-Alder-(RDA)-Spaltungen erlauben hier keine weiteren Aufschlüsse über Substitutionsmuster.

- Die Fragmentierung des Zuckers ist mit dem Verlust von Wasserstoff verbunden und liefert einige charakteristische Fragmente: Bei m/e 740 (OS-H) ein Fragment, das der Abspaltung der Rutinose entspricht (das gleiche Fragment erscheint auch bei Neohesperidose und Robinobiose), bei m/e 362 (T-H) das Fragment der Rhamnose. Diese Fragmente sind in allen 4 Verbindungen vorhanden, da alle Aglykone an Rutinose gebunden sind.

Einen Hinweis auf die Interglykosidbindung (1 —— 6) gibt das Auftreten nur eines intensiven OS-H-Fragments. Bei Vorliegen einer 1 —— 2 Bindung (z.B. Neohesperidose) entstehen zusätzlich OS-ROH-Fragmente bei m/e 651.

Aus den Spektren der trimethylsilylierten Rutoside können also, außer über die Zahl der Substituenten, keine weiteren Aussagen über das Aglykon gemacht werden.
Aus diesem Grund wurde das Rutosidgemisch einer sauren Hydrolyse unterworfen, das Hydrolysat über Amberlite XAD-2 gereinigt und die freien Aglykone über eine Säule mit Sephadex LH-20 chromatographiert. Abb. 17 zeigt das Ergebnis dieser Chromatographie. Offensichtlich ist eine brauchbare Trennung der einzelnen Komponenten des Hydrolysates auf diese Weise möglich.

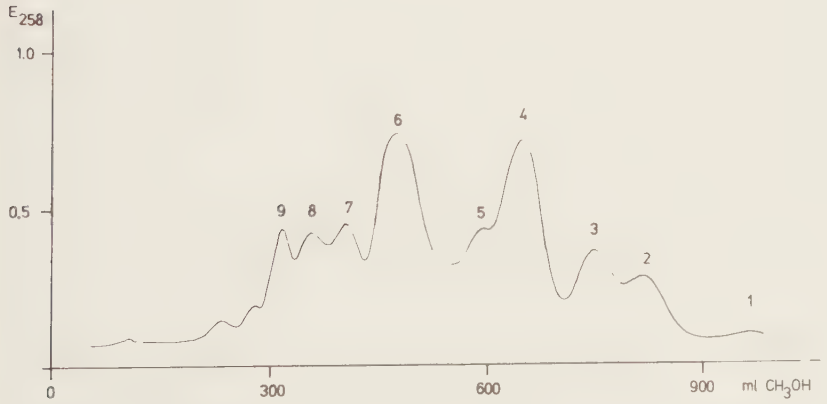



Abb. 17: Sephadex LH-20-Chromatographie des Hydrolysates von O-(β-hydroxyethyl)-Rutosid. Elutionsmittel Methanol.

Zur Identifizierung wurden die isolierten Komponenten trimethylsilyliert und im Gaschromatographen über eine Kapillarsäule eluiert. Die Retentionszeiten wurden dann mit einem Chromatogramm des Ausgangsgemisches verglichen. In Abb. 18 ist das Gaschromatogramm des trimethylsilylierten Aglykongemisches dargestellt.

Abb. 18: Kapillargaschromatogramm der trimethylsilylierten Aglykone von O-(β-hydroxyethyl)-Rutosid. 1 = Quercetin, 2 = Monoether, 3,4 = Diether, 5,6 = Triether, 7 = Tetraether.

Durch Kopplung des Gaschromatographen mit dem Massenspektrometer (GC-MS) konnten die Massenspektren der nacheinander eluierten Derivate aufgenommen werden. Das Spektrum des bekannten 7,3',4'-Triethers ist in Abb. 19 abgebildet.
Mit GC-MS können 1 mono-, 2 di-, 2 tri- und 1 tetrasubstituiertes Produkt nachgewiesen werden. Auch aus dem in Abb. 19 abgebildeten Spektrum und aus dem zugehörigen Fragmentierungsschema (Abb. 20) wird deutlich, daß wegen fehlender aglykonspezifischer Fragmente im unteren Massenbereich keine Identifizierung des Substitutionsmusters möglich ist.

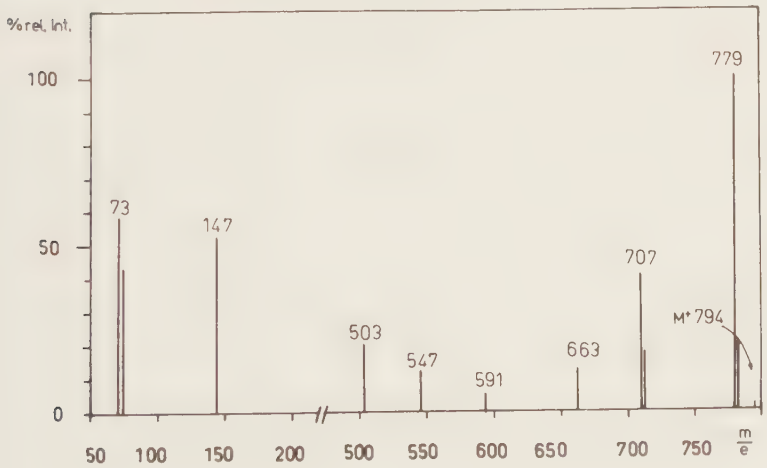



Abb. 19: Massenspektrum des 7,3',4'-Triether-TMS-Derivats

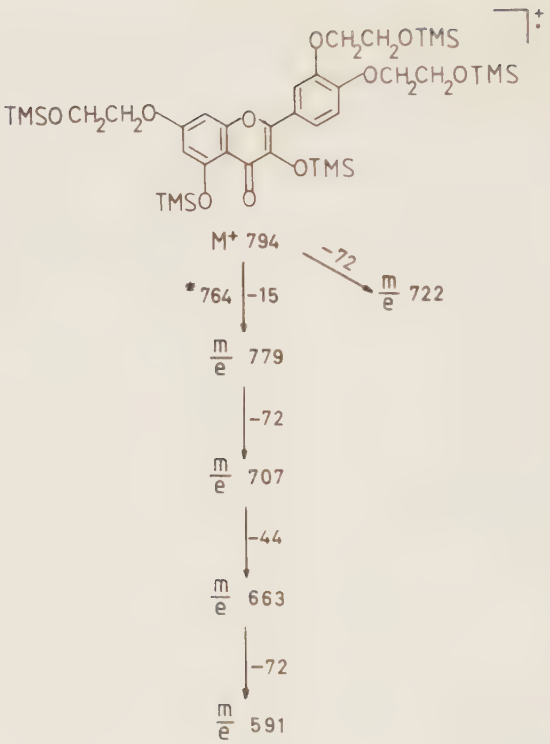



Abb. 20: Fragmentierungsschema des 7,3',4'-Triether-TMS-Derivats.

Aus den Arbeiten von Schmid und anderen Autoren[37,38] ist bekannt, daß charakteristische RDA-Fragmente von den permethylierten Flavonol-Aglykonen zu erwarten sind. Daher wurden die chromatographisch isolierten Aglykone nach Hakomori[10] permethyliert bzw. perdeuteromethyliert. Die methylierten Verbindungen wurden durch HPLC gereinigt und über das Direkteinlaßsystem des Massenspektrometers vermessen.

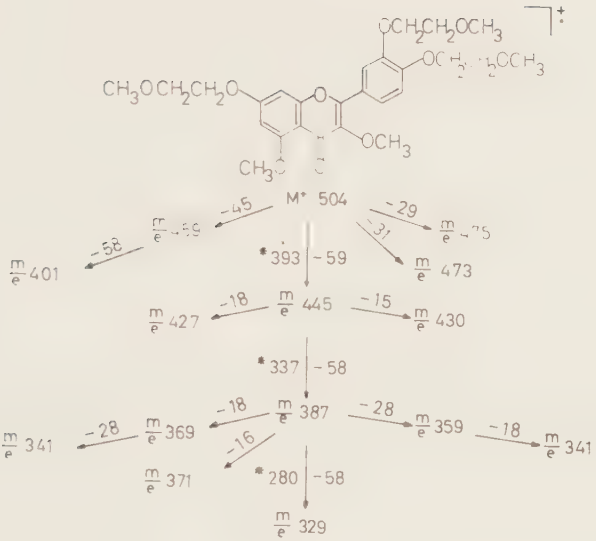



Abb. 21: Fragmentierungsschema des permethylierten 7,3',4'-Triethers.

Abbildung 21 zeigt das allgemeine Fragmentierungsschema der permethylierten Aglykone am Beispiel des 7,3',4'-trisubstituierten Derivats. Die dominierenden Fragmente entstehen durch Abspaltung der Seitenketten und werden von metastabilen Übergangssignalen begleitet. Die Abspaltung der Methoxyethylsubstituenten erfolgt in einem Falle ohne Protonenwanderung, was durch den Verlust von 59 Masseneinheiten angezeigt wird, in den anderen Fällen unter Protonenwanderung und durch einen Verlust von 58 Masseneinheiten bestätigt wird. Ein intensives Signal bei M-H tritt bei allen untersuchten Verbindungen einschließlich der perdeuteromethylierten Deri-

vate auf. Auf diese Tatsache wurde bereits von Schmid et al.[37] hingewiesen. Es bedeutet, daß ein Wasserstoffatom dem aromatischen Kern und nicht etwa den Methylgruppen entzogen wird. Im unteren Meßbereich treten nur wenige Fragmente auf, so daß die zwar oft wenig intensiven aber charakteristischen RDA-Fragmente zur Identifizierung des Substitutionsmusters herangezogen werden können.

Fraktion 1 der Sephadex-Chromatographie (siehe Abb. 17) konnte bereits durch Vergleich der Retentionszeit gaschromatographisch als Quercetin bestimmt werden. Das Massenspektrum der underivatisierten Verbindung bestätigte diesen Befund.

Bei Fraktion 2 ist das Molekülion bei m/e 416 das intensivste Ion des Spektrums. Dies bestätigte das Vorliegen eines Monoethers. Die RDA-Fragmente bei m/e 151, 181 und 209 legten eine 3'- oder 4'-Substitution nahe. Eine Entscheidung zwischen beiden Isomeren war massenspektrometrisch nicht möglich (siehe Abb. 22 + 22a).

Fraktion 3 erwies sich als Monoether. Die Fragmente der RDA-Spaltung lassen entweder eine 5- oder 7-Substitution zu. Zwischen beiden Alternativen konnte durch das UV-Spektrum entschieden und die Struktur als 7-Mono-Substitution festgelegt werden (siehe Abb. 23 + 23a)[39,25].

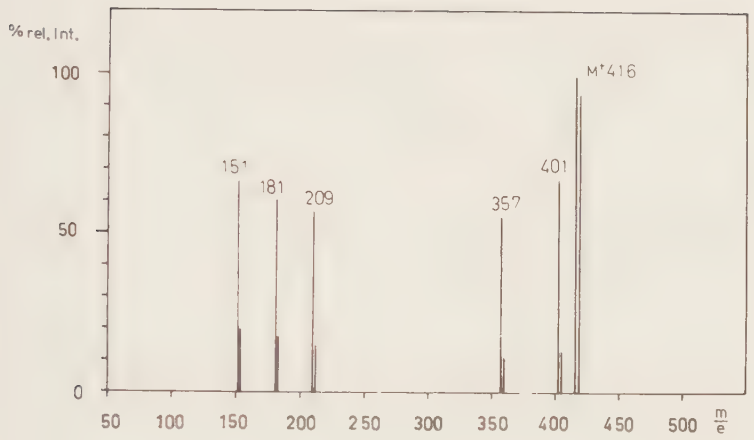
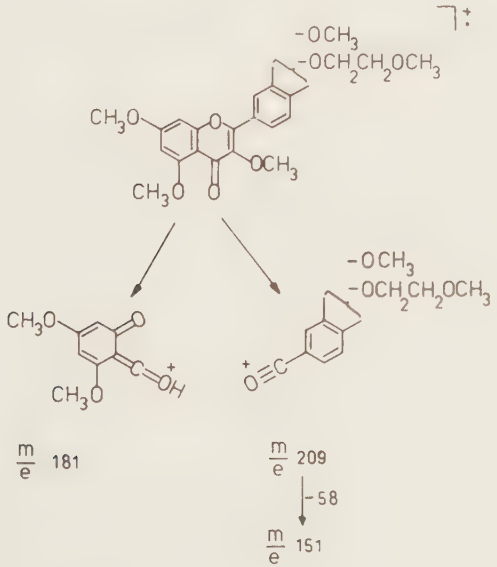



Abb. 22 + 22a: Massenspektrum des permethylierten Monoethers von Fraktion 2, sowie das zugehörige RDA-Schema.



Fraktion 4 konnte als Diether identifiziert werden, der entweder 7,3'- oder 7,4'-substituiert ist. Massenspektrometrisch konnte zwischen beiden Möglichkeiten nicht unterschieden werden (siehe Abb. 24 + 24a).

Fraktion 5 war ebenfalls ein 7,3'- oder 7,4'-substituierter Diether. Das Massenspektrum war mit der Fraktion 4 identisch.

Fraktion 6 konnte unter Berücksichtigung der UV-Absorption als 7,3',4'-Triether identifiziert werden (siehe Abb. 25 + 25a).

Bei Fraktion 7 handelte es sich ebenfalls um einen Triether, der jedoch nur in geringen Mengen und zudem mit dem vorhergehenden Isomeren verunreinigt isoliert werden konnte, so daß hier keine eindeutige Zuordnung der Substituenten möglich war.

Fraktion 8 konnte ohne weiteres als 5,7,3',4'-Tetraether bestimmt werden (siehe Abb. 26 + 26a).

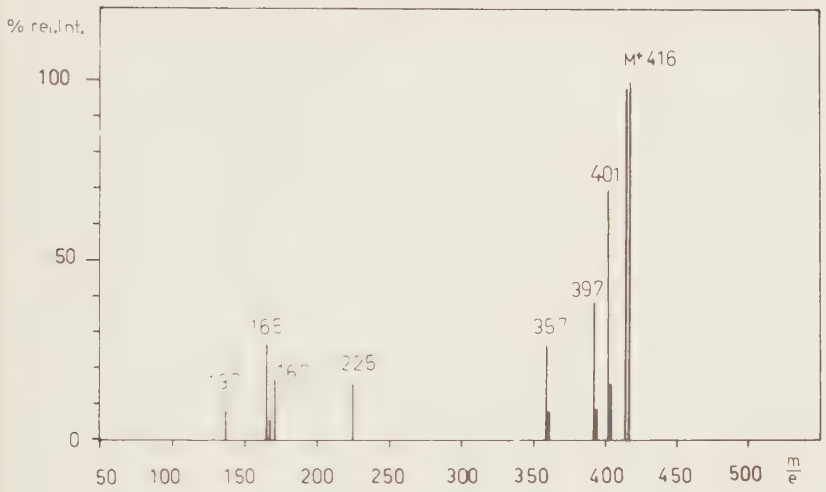
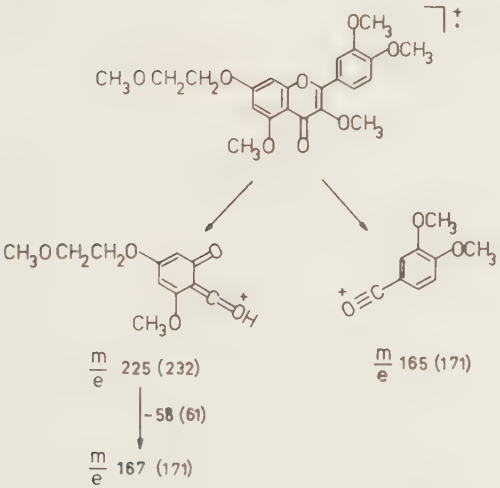



Abb. 23 + 23a: Massenspektrum des permethylierten Monoethers von Fraktion 3 sowie das zugehörige RDA-Schema.



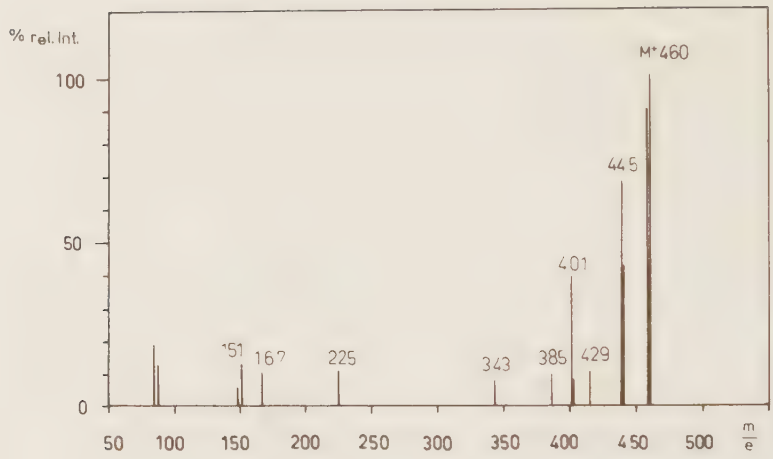
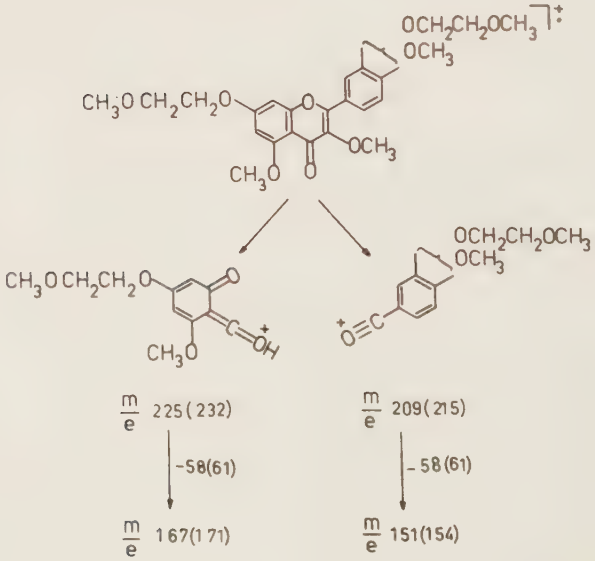



Abb. 24 + 24a: Massenspektrum des permethylierten Diethers von Fraktion 4 mit zugehörigem RDA-Schema.



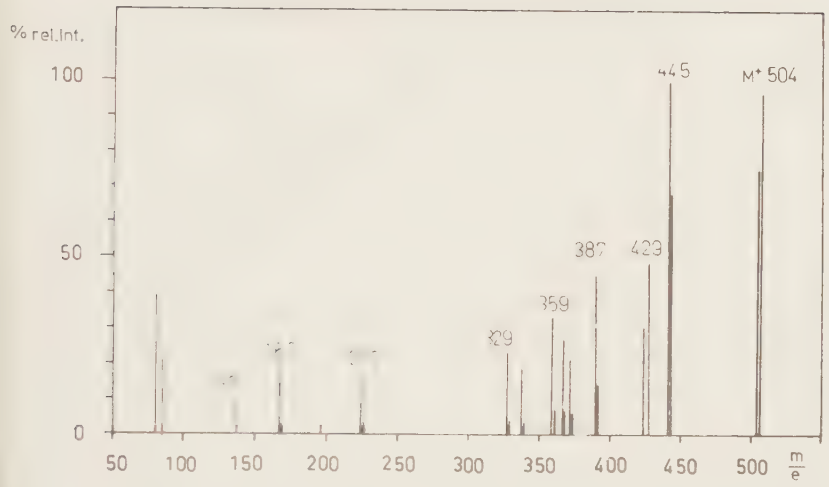
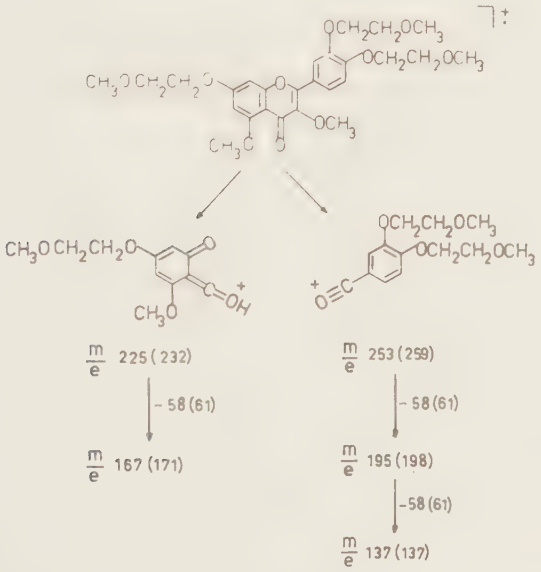



Abb. 25 + 25a: Massenspektrum des permethylierten Triethers von Fraktion 6 mit zugehörigem RDA-Schema.



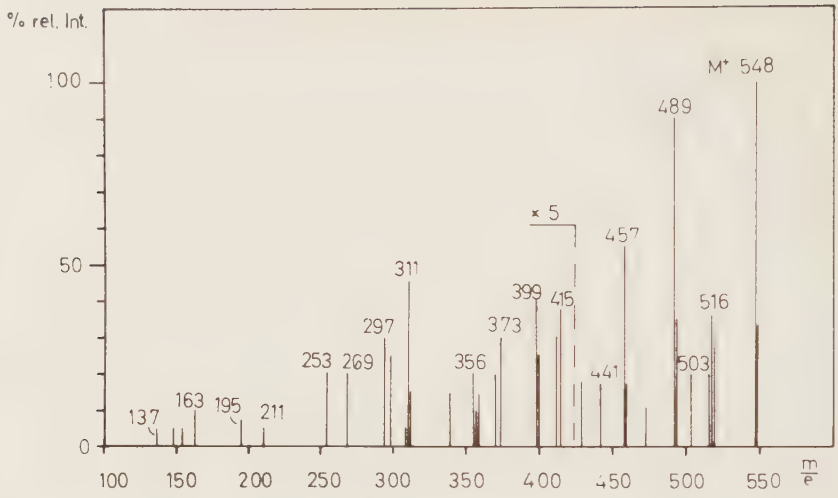
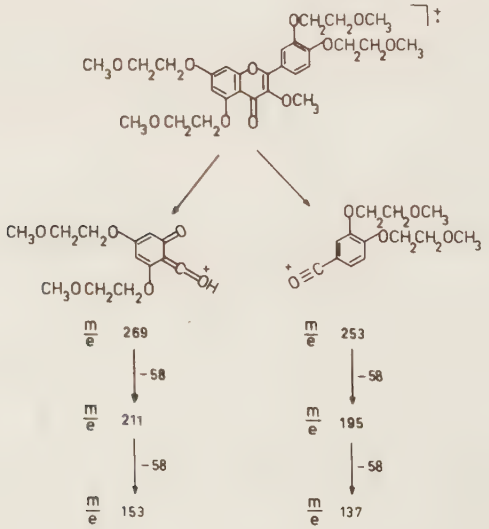



Abb. 26 + 26a: Massenspektrum des permethylierten Tetraethers von Fraktion 8 mit zugehörigem RDA-Schema.



Bei Fraktion 9 handelte es sich ebenfalls um einen Tetraether, der aufgrund der RDA-Fragmente als 3,7,3',4'-substituiert anzusehen war. Eine 5-Substitution schied aufgrund der UV-Absorption aus. Die Entstehung dieser Verbindung ist wohl auf eine Verunreinigung des Ausgangsmaterials mit Quercetin zurückzuführen.

Um die quantitative Verteilung der identifizierten Komponenten zu bestimmen, wurde die trimethylsilylierte Aglykonmischung im Massenspektrometer unter Selected-ion-monitoring (SIM)-Bedingungen vermessen. Das Prinzip dieser Technik sei hier kurz erklärt[40]. Während der Verdampfung des Substanzgemisches im Direkteinlaßsystem des Massenspektrometers wird rechnergesteuert durch Variation der Beschleunigungsspannung im Intervall von wenigen Mikrosekunden die Fokussierung nacheinander auf 4 vorgewählte, substanzspezifische Massenwerte eingestellt und der momentane Ionenstrom dieser Fragmente registriert. Die vorgewählten Fragmente waren spezifisch für jeweils eine Komponente. Im Verlaufe der vollständigen Verdampfung der Substanzen wird also für jedes Ion ein Massenfragmentogramm aufgenommen, dessen Fläche der Substanzmenge der Einzelsubstanz proportional ist.
Im Verlauf dieser Messung treten im Gerät durch die Veränderung der Beschleunigungsspannung zwangsläufig geringe Änderungen der optimalen Fokussierungsbedingungen auf. Dies wirkt sich in einer unterschiedlichen Empfindlichkeit für die einzelnen registrierten Ionen aus. Aus diesem Grund müssen für

Einzelkomponenten unter gleichen Bedingungen Eichkurven aufgenommen werden. Sowohl die Mono- als auch die Di-, Tri- und Tetraether zeigen in ihren TMS-Spektren (siehe in Abb. 19 das Beispiel des 7,3',4'-Triethers) ein intensives Signal bei M-15, das der Abspaltung einer Methylgruppe aus dem Molekülion entspricht. Dieses Signal ist base-peak und charakteristisch für jede Komponente, die denselben Substitutionsgrad besitzt.

In Abb. 27 sind die Massenfragmentogramme dieser ausgewählten Ionen aufgetragen. Fragment m/e 691 registriert die beiden Monoether, m/e 735 die beiden Diether, m/e 779 die beiden Triether und m/e 823 die beiden Tetraether.

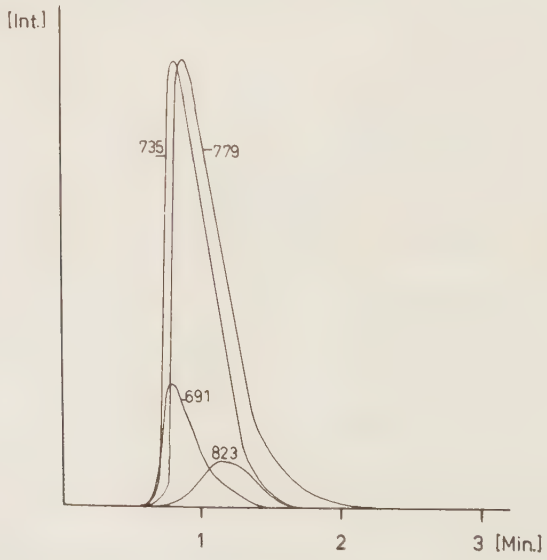



Abb. 27: Massenfragmentogramme der Ionen m/e 691, m/e 735, m/e 779, m/e 823.

In Abb. 28 sind die Eichkurven der Einzelisomeren abgebildet. In einem Bereich von 10 bis 100 ng derivatisierter Substanz besteht eine lineare Beziehung zur registrierten Fläche des Massenfragmentogramms. Zur quantitativen Bestimmung der Einzelkomponenten werden die unter SIM-Bedingungen erhaltenen Flächenwerte zunächst korrigiert. Dazu werden die Flächenbeiträge eliminiert, die nicht aus der zu bestimmenden Substanz stammen. Beispielsweise wird reiner 5,7,3', 4'-Tetraether unter SIM-Bedingungen vermessen und es werden die Flächenwerte der Fragmente bestimmt, die charakteristisch für die Mono-, Di- und Triether sind. Diese Beiträge werden von den aus der Gemischanalyse erhaltenen Flächenwerten für die Mono-, Di- und Triether abgezogen. In gleicher Weise verfährt man mit den reinen Tri- und Diethern und korrigiert die Di- und Mono- bzw. die Monoetherwerte aus der Gemischanalyse. Auf diese Weise werden von jedem Flächenwert der Gemischanalyse die Beiträge subtrahiert, die nicht aus der zu bestimmenden Einzelkomponente stammen. Mit den derart korrigierten Werten entnimmt man den Eichkurven die entsprechenden Substanzmengen. Diese setzt man zueinander in das prozentuale Verhältnis und erhält die Verteilung für die Einzelkomponenten (siehe Tab. 3 auf Seite 59).

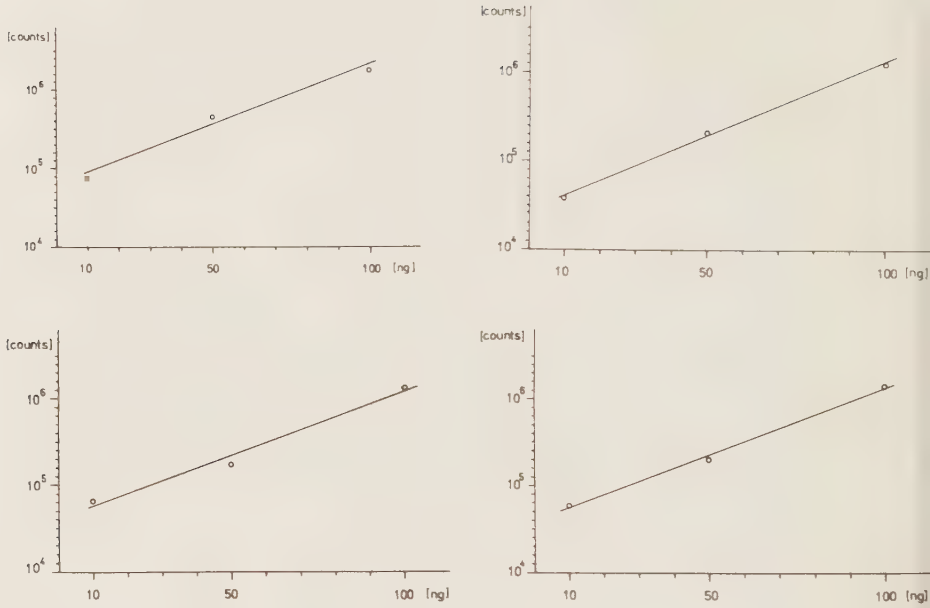



Abb. 28: SIM-Eichkurven der Einzelkomponenten: oben links - Monoether, oben rechts - Diether, unten links - Triether, unten rechts - Tetraether.

Offensichtlich erlaubt die Methode keine weitere Differenzierung der Isomeren untereinander, da z.B. der 7-Monoether und der 3'(4')-Monoether dasselbe Fragment M-15 liefern. Ein Vergleich der SIM-Werte mit den durch Integration des GC-Chromatogramms der TMS-Derivate (Abb. 18) erhaltenen zeigt deutliche Differenzen (siehe Tab. 3).

| VERBINDUNG | SIM | GC |
|---|---|---|
| Monoether | 26 | 11 |
| Diether | 31 | 36 |
| Triether | 31 | 40 |
| Tetraether | 11 | 13 |

Tab. 3: Vergleich der prozentualen Anteile der Einzelkomponenten in O-(β-hydroxyethyl)rutosid nach der SIM-Methode bzw. durch Integration des Gaschromatogramms (Abb. 18).

Durch Injektion gleicher Mengen der Einzelkomponenten in die Glaskapillarsäule des Gaschromatographen konnte jedoch gezeigt werden, daß in ihrer Fläche stark voneinander abweichende Signale für die verschiedenen Komponenten erhalten wurden. Somit ist die Aussage einer einfachen Integration in diesem Falle unzulässig. Immerhin können dem Gaschromatogramm (Abb. 18) einige wichtige Informationen entnommen werden:

- Die beiden Diether treten in einem Verhältnis von 1:1,6 auf.
- Der nicht identifizierte Triether liegt zu etwa 7 % vor.
- Beide Tetraether liegen in einem Verhältnis von etwa 1:1 vor.
- Nicht identifizierte Spurenkomponenten machen zusammen 10 % aus.

5. Versuche zur quantitativen Bestimmung O-ß-hydroxyethylierter Rutoside in Humanserum

Die Verwendung der Hydroxyethylrutoside (HER) bei der Behandlung von Ödemen, Strahlenschäden und anderen Erkrankungen legt die Frage nahe, ob und auf welche Weise diese Verbindungen nach oraler Verabreichung im menschlichen Blut nachgewiesen werden können. Um gegebenenfalls pharmakokinetische Untersuchungen durchführen zu können, sollte eine Methode nicht nur empfindlich, sondern auch quantitativ auswertbar sein.
Wie im vorhergehenden Kapitel 4 gezeigt wurde, ist die Gaschromatographie in der Lage, die einzelnen Komponenten von HER zu trennen und zu identifizieren. Dies gilt nach vorangehender Probenaufbereitung auch für Hydroxyethylrutoside, die aus Humanserum isoliert wurden (siehe Abb. 29).

Die untere Nachweisgrenze für das reine Gemisch der Hydroxyethylrutoside liegt bei Verwendung eines Flammenionisationsdetektors bei etwa 100 ng derivatisierter Einzelkomponente. Diese Empfindlichkeit ist nicht ausreichend, um die geringen Mengen HER in Humanserum nachzuweisen, die z.B. nach oraler Applikation zu erwarten sind (etwa 1 - 10 µg HER/ml Serum), da die Verluste während der Reinigung berücksichtigt werden müssen. Die Verwendung eines Electron-Capture-Detektors (ECD) würde die Empfindlichkeit zwar erheblich steigern, doch müssen die zu vermessenden Produkte relativ rein sein, was in der Regel nur mit hohen Ausbeuteverlusten erreicht werden kann.

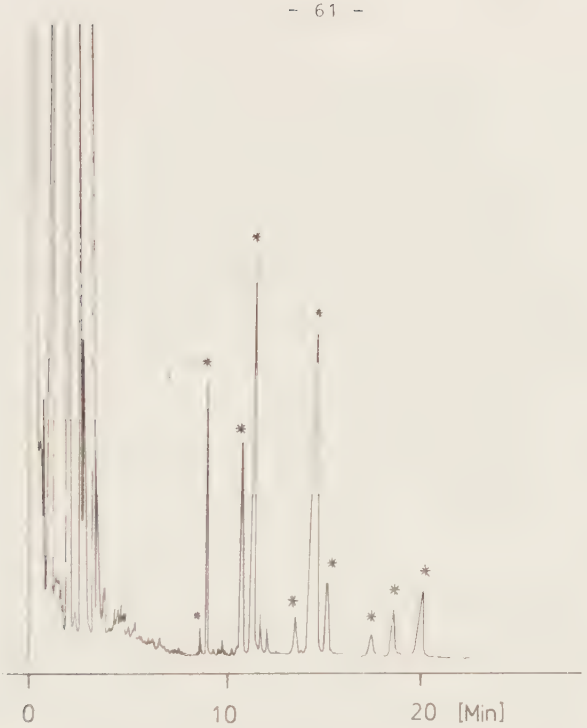



Abb. 29: Kapillargaschromatogramm einer aufgearbeiteten Serumprobe, die zugesetztes HER enthält. Die Signale der HER-Komponenten sind mit * gekennzeichnet.

Eine weitere Methodik, die die Anforderungen hoher Empfindlichkeit und guter Trennleistung erfüllt, ist die bereits beschriebene Selected-Ion-Monitoring (SIM)-Technik, die eine spezielle Modifikation der Massenspektrometrie darstellt. Grundsätzlich sind dafür zwei Meßanordnungen möglich, eine GC-MS-Kopplung oder die Direktverdampfung. Die GC-MS-Kopplung bietet den Vorteil, daß die Trennleistung des Gaschromatographen ein weiteres Kriterium zur Identifizierung der

gesuchten Substanz liefert. Allerdings müssen die Verbindungen ausreichend flüchtig sein. Bei Verwendung des Direkteinlaßsystems können auch schwer flüchtige Verbindungen verdampft werden und so zur Messung gelangen. Dafür entfällt hier der Separationsschritt der GC-Säule. Bei den trimethylsilylierten Flavonolen sind grundsätzlich beide Varianten, GC-MS-Kopplung oder Direktverdampfung anwendbar, doch gelang es trotz zahlreicher Versuche nicht, die trimethylsilylierten Aglykone in Mengen unter 1 Mikrogramm über das GC-MS-System zu vermessen.

Wahrscheinlich wurde die injizierte Substanz von oberflächenaktiven Kopplungsteilen restlos absorbiert und gelangte nicht in die Ionenquelle. Derselbe Effekt trat bei Injektion der permethylierten Flavonole auf. Aus diesem Grund führten wir die Proben, trimethylsilyliert, über das Direkteinlaßsystem zu.

Der massenspektroskopischen Messung muß eine Reinigung der in Humanserum gelösten Hydroxyethylrutoside vorangehen, da die Vielzahl der im Serum vorliegenden Verbindungen die direkte Analyse unmöglich machen (siehe Abb. 30).

Durch Zugabe von Aceton wurde aus dem Serum die Hauptmenge der Serumproteine ausgefällt. Die Hydroxyethylrutoside blieben im Überstand gelöst. Eine saure Hydrolyse des Überstandes setzte aus den Rutosiden die Aglykone frei. Danach folgte eine Chromatographie des Hydrolysates mit $H_2O$ als Elutionsmittel an einer XAD-2-Säule. Dabei wurden die freien Aglykone der Hydroxyethylrutoside sowie andere aromatische Kom-

ponenten zurückgehalten, während die freien Zucker, Salze und viele Aminosäuren ausgewaschen wurden. Durch Elution mit Methanol konnten die noch auf dem Harz verbliebenen Substanzen, also auch die Aglykone erhalten werden. Das Methanoleluat wurde zur Trockene eingeengt und trimethylsilyliert. Aliquote dieses Derivats gelangten zur massenspektrometrischen Messung.

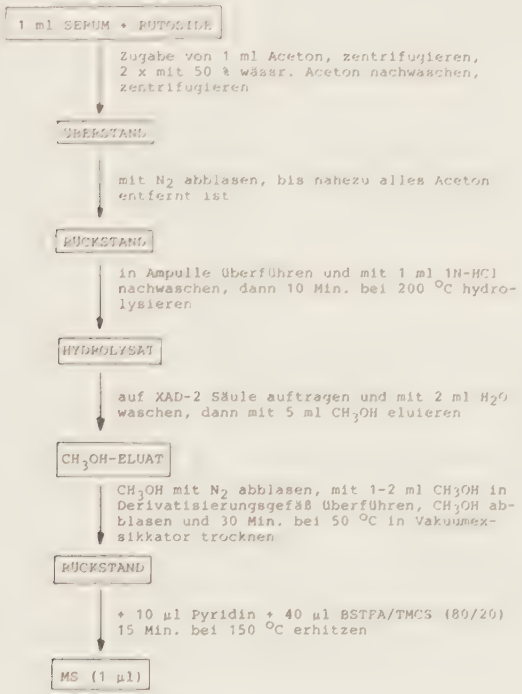



Abb. 30: Aufarbeitungsschema für die β-hydroxyethylierten Rutoside in Humanserum.

Die einzelnen Schritte dieser Aufarbeitung wurden sorgfältig untersucht. Bei der Hydrolyse zeigte sich, daß längere Hydrolysezeiten bei tieferen Temperaturen zu Abbauprodukten der freien Aglykone führten. Wahrscheinlich wurde außer der glykosidischen Bindung auch die Etherbindung der Hydroxyethylseitenkette gespalten. Bei der XAD-2-Chromatographie konnte mit den Reinsubstanzen sichergestellt werden, daß diese nicht mit Wasser eluiert wurden.

Schließlich wurde die Ausbeute der Aufarbeitung durch die Verwendung von $^{14}$C-markiertem HER bestimmt. Die Aktivität, die nach der durchgeführten Aufarbeitung noch vorhanden war, wurde in einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt und mit einer Standardlösung verglichen. Nach der Acetonfällung waren noch etwa 92 % (65418 counts) der eingesetzten Aktivität (72793 counts) vorhanden, vor dem Derivatisierungsschritt zwischen 50 und 60 % (36000 - 44000 counts).

Zu einem ml Serum wurden einmal 20 µg 7-Mono-Rutosid und in einem zweiten Ansatz 20 µg Tetra-Rutosid zugesetzt und nach Abb. 30 aufgearbeitet. Lediglich im ersten Schritt wurde mit reinem Aceton nachgewaschen an Stelle des 50 % wässrigen Acetons. Dies senkt zwar die Ausbeute, wie zuvor durch die Aufarbeitung von $^{14}$C-markiertem HER gezeigt werden konnte, um etwa 15 - 20 %, dafür gelangen weniger Fremdsubstanzen in das gereinigte Material.

Die Vermessung der gereinigten Isomeren und ihre nachfolgende Auswertung mit Hilfe der Eichkurven ergab sowohl beim 7-Mono- als auch beim Tetra-Rutosid eine Ausbeute von etwa

31 %. Offenbar wurden beide Isomere trotz ihrer deutlich unterschiedlichen Löslichkeit in gleichem Maße während der Aufarbeitung extrahiert. Versuche, das Gesamtgemisch in Serum quantitativ zu bestimmen, verliefen unbefriedigend, da störende Begleitstoffe das Ergebnis verfälschten und deshalb zwar eine qualitative Bestimmung, aber keine Quantifizierung mehr möglich war. Dieses Problem ließe sich zwar durch weitere Reinigung eliminieren, doch letztlich auf Kosten der Gesamtausbeute. Darin liegt auch der grundsätzliche Nachteil der Direktverdampfung - für reproduzierbare Messungen müssen die Proben weitgehend vorgereinigt sein. Dies gilt in viel geringerem Maße für die GC-MS-Kopplung, da hier Fremdsignale anhand der Retentionszeit eliminiert werden können.
Welche Konsequenzen können aus diesen Vorversuchen für weitere Arbeiten gezogen werden?
Zwei Wege der Problemlösung bieten sich an. Der eine führt über eine GC-MS-Kopplung und dem Nachweis der Substanzen durch SIM. Dabei müßten vor allen Dingen die Probleme der eigentlichen Kopplung überwunden werden, u.U. durch Verwendung einer gepackten Säule mit Separator. In diesem Fall wäre allerdings zu prüfen, ob bei geringen Substanzmengen noch eine quantitative Überführung in die Ionisierungskammer gelingt. Ein wesentlicher Vorteil der gepackten Säule besteht in der Möglichkeit, ein größeres Probenvolumen injizieren zu können als bei einer Kapillarsäule (etwa 2 - 3 µl gegenüber 0,1 µl). Außerdem kann die in Abb. 30 dargestellte Aufarbeitung benutzt werden, deren Ausbeute bei etwa

50 % liegt. Schließlich können bei der Kopplung mit einem Gaschromatographen die einzelnen Isomeren getrennt nachgewiesen werden, dagegen ist in der Direktverdampfung nur eine kollektive Registrierung isomerer Ether möglich. Ein nach wie vor bestehender grundsätzlicher Nachteil liegt in der geringen Ionenausbeute der untersuchten Substanzen, die eine deutliche Einschränkung der Empfindlichkeit darstellt.

Ein zweiter Weg besteht in der Suche nach einem geeigneten halogenierten Derivat, das bei Verwendung eines Gaschromatographen mit ECD-Detektor empfindlich nachgewiesen werden kann. Der Einsatz des ECD setzt zwar eine relativ hohe Reinheit der zu vermessenden Substanzen voraus, was letztlich Ausbeuteverluste bei der Aufreinigung bedingt, doch können diese durch die hohe Empfindlichkeit des Detektors mehr als kompensiert werden. Schließlich wäre hier, im Vergleich zur zuvor geschilderten Methode, der dort doch erhebliche apparative Aufwand wesentlich geringer.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, am Beispiel einiger naturstoffchemischer Probleme die vorteilhafte Anwendung spezieller Techniken der Kernresonanzspektroskopie und der Massenspektrometrie zu demonstrieren.

Juvenilhormon III und analoge Verbindungen wurden mit der $^{13}$C-NMR-Spektroskopie untersucht. Da die Lage der Resonanzsignale einzelner Kohlenstoffatome durch unterschiedliche Substituenten stark verändert wird, war eine eindeutige Identifizierung der untersuchten Verbindungen möglich.
Am Beispiel der Juvenilhormone I und III konnte gezeigt werden, daß die $^{1}$H-Kernresonanzspektren dieser Verbindungen durch die Anwendung von Verschiebungsreagenzien stark vereinfacht werden können. Eine Zuordnung einzelner Resonanzsignale zu bestimmten Protonen wurde dadurch erleichtert. Die genaue Betrachtung der Größe der induzierten chemischen Verschiebung der Protonen zeigte, daß die Basizität von Epoxy- und Methylestergruppe von vergleichbarer Größe ist.

Die Verwendung von Lanthanidsalzen in der $^{1}$H-NMR-Spektroskopie von Flavonolen erlaubte eine Abschätzung der Komplexierungstendenz dieser Verbindungen. Die Anwendung von Salzen der seltenen Erden als Verschiebungsreagenzien war bei den untersuchten Flavonolen nur mit Einschränkungen möglich.

Mit Hilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie konnte ein komplexes Gemisch von O-ß-hydroxyethylierten Rutosiden in seiner qualitativen und quantitativen Zusammensetzung bestimmt werden. Für die Identifizierung der Einzelkomponenten wurden die permethylierten Derivate hergestellt, deren massenspektrometrische Fragmentierungen Aussagen über das Substitutionsmuster der Flavonolaglykone erlaubten.

Für die quantitative Analyse wurde eine besondere Technik der Massenspektrometrie, das SIM-Verfahren verwendet. Dadurch war ein besonders empfindlicher Nachweis der untersuchten Flavonole möglich.
Schließlich wurde der Versuch unternommen, Hydroxyethylrutoside aus Humanserum zu isolieren und mit dem SIM-Verfahren quantitativ nachzuweisen. Ein geeignetes Aufarbeitungsverfahren wurde entwickelt, das für eine anschließende gaschromatographische Vermessung der Hydroxyethylrutoside ausreichend war. Eine Kopplung GC-MS versagte jedoch bei der Bestimmung von Substanzmengen unter 1 µg; wahrscheinlich traten Absorptionen an oberflächenaktiven Kopplungsteilen auf. Aus diesem Grund mußten die aufgearbeiteten Substanzen über das Direkteinlaßsystem des Massenspektrometers vermessen werden. Dabei zeigte sich, daß neben den Hydroxyethylrutosiden zu viele Fremdstoffe vorlagen, die das Meßergebnis verfälschten und eine quantitative Bestimmung verhinderten.

LITERATUR

1) E. Breitmaier, G. Jung, W. Voelter, Angew. Chem. 83, 659-672 (1971)

2) V.B. Wigglesworth, "Insect Hormones", Oliver und Boyd, Edinburg 1970, S. 62 ff.

3) H. Röller, K.H. Dahm, C.C. Sweely, B.M. Trost, Angew. Chem. Int. Ed. 6, 179-180 (1967)

4) K.H. Dahm, B.M. Trost, H. Röller, J. Amer. Chem. Soc. 89, 5292-5294 (1967)

5) "The Flavonoids" (J.B. Harborne, T.J. Mabry, H. Mabry, Ed.)

6) H. Grisebach, I. Ebel, Angew. Chem. 90, 668-681 (1978)

7) P. Bruckner, A. Szent-Györgyi, Nature 138, 1057 (1936)

8) L.W. Mapson in "The Biochemistry of Fruits and their Products" Vol. 1 (A.C. Hulme, Ed.) Academic Press, New York und London 1970, 369-384

9) D.S. van Fleet, in "Advancing Frontiers of Plant Science" Vol. 23 (L. Chandra, Ed.) Impex, New Delhi 1969, 65-89

10) S. Hakomori, J. Biochem. 55, 205-208 (1964)

11) D. Reibstein, J.H. Law, S.B. Bowlus und J.A. Katzenellenbogen, in "The Juvenile Hormones" (L.I. Gilbert, Ed.), Plenum Press, New York 1976, 131-146

12) A.M. Ajami, L.M. Riddiford, J. Insect Physiol. 19, 635-645 (1973)

13) B.I. Bergot, D.A. Schooley, G.M. Chippendale, Chi-Ming Yin, Life Sci. 18, 811-820 (1976)

14) M.G. Peter, K.H. Dahm, H. Röller, Z. Naturforsch. Teil C 31, 129-131 (1976)

15a) E.G. Paul, D.M. Grant, J. Amer. Chem. Soc. 85, 1701-1702 (1963)

b) D.M. Grant, E.G. Paul, J. Amer. Chem. Soc. 86, 2984-2990 (1964)

16) E. Breitmeier, W. Voelter, "$^{13}$C-NMR-Spectroscopy", Verlag Chemie, Weinheim, 1974

17) D.R. Paulson, F.Y.N. Tang, G.F. Moran, A.S. Murray, B.P. Pelkoy, E.M. Vasquez, J. Org. Chem. 40, 184-186 (1975)

18) M. Jautelat, I.B. Grutzner, I.D. Roberts, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 65, 288-292 (1970)

19) "Topics in Carbon-13 NMR Spectroscopy" (G.C. Levy, Ed.) Wiley, New York (1976) Vol. 2

20) C.C. Hinckley, J. Amer. Chem. Soc. 91, 5160-5162 (1969)

21) A.F. Cockerill, G.I. Davies, R.C. Harden, G.M. Rackham, Chem. Rev. 73, 553-588 (1975)

22) O. Hofer, in "Topics in Stereochemistry" Vol. 9 (N.L. Allinger, E.L. Eliel, Ed.) Wiley, New York (1976), 111-197

23) P.E. Manni, G.A. Howie, B. Katz, J.M. Cassady, J. org. Chem. 37, 2769-2771 (1972)

24) H. Hart, G.M. Love, Tetrahedron Lett. 7, 625-628 (1971)

25) T.J. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas in "The Systematic Identification of Flavonoids", Springer Verlag 1970

26) L. Jurd, Phytochem. 8, 445-462 (1969)

27) L.J. Porter, K.R. Markham, Phytochem. 9, 1363-1365 (1970)

28a) L.J. Porter, K.R. Markham, J. Chem. Soc. (C), 344-349 (1970)

b) L.J. Porter, K.R. Markham, J. Chem. Soc. (C), 1309-1313 (1970)

29) L.J. Porter, K.R. Markham, Phytochem. 11, 1477-1478 (1972)

30) A.F. Cockerill, G.L.O. Davis, R.C. Harden, D.M. Rackham, Chem. Rev. 73, 553-588 (1973)

31) E.R. Birnbaum, T. Moeller, J. Amer. Chem. Soc. 91, 7274-7280 (1969)

32) J.K.M. Sanders, S.W. Hanson, D.H. Williams, J. Amer. Chem. Soc. 94, 5325-5335 (1971)

33) H.M. McConnell, R.E. Robertson, J. Chem. Phys. 29, 1361-1365 (1958)

34) A. Pomillo, B. Ellmann, K. Künstler, G. Schilling, K. Weinges, Liebigs Ann. Chem. 588-596 (1977)

35) F.A. Cotton, G. Wilkinson, "Anorganische Chemie", Verlag Chemie 1974, 1123

36) H. Scheels, H.D. Zinsmeister, K. Pfleger, Phytochem. 16, 1019-1023 (1977)

37) R.D. Schmid, R. Mues, J.H. McReynolds, G. Vander Velde, N. Nakatani, E. Rodriguez, T.J. Mabry, Phytochem. 12, 2765-2772 (1973)

38) D.G.I. Kingston, Tetrahedron 27, 2691-2700 (1971)

39) P. Courbat, A. Valenza, Helv. chim. acta 56, 1604-1614 (1973)

40) C.B. Hammar, B. Holmstedt, R. Rhyhage, Anal. Biochem. 25, 532-548 (1968)

41) R.J. Anderson, C.A. Henrick, J.B. Siddall, R. Zurflüh, J. Amer. Chem. Soc. 94, 5379-5386 (1972)

42) C.A. Henrick, F. Schaub, J.B. Siddall, J. Amer. Chem. Soc. 94, 5374-5378 (1972)

LEBENSLAUF

Am 10. September 1949 wurde ich als Sohn des Soldaten Wilhelm Kuhnz und seiner Ehefrau Karolina in Oberkammlach, Bayern, geboren.
Von 1962 bis 1968 besuchte ich das staatliche Gymnasium in Sigmaringen. Hier legte ich im Juni 1968 die Reifeprüfung ab.
Nach Ableistung des Wehrdienstes von Juli 1968 bis September 1969 nahm ich im Wintersemester 1969/70 in Freiburg das Studium der Chemie auf. Nachdem ich im Juni 1975 die Diplomchemiker-Hauptprüfung erfolgreich abgelegt hatte, begann ich im September 1975 mit der Doktorarbeit auf dem Gebiet der Naturstoffchemie bei Prof. Dr. H. Rembold am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried. Diese Arbeiten wurden im April 1979 abgeschlossen.